

**Entwicklung einer API-Produktionsplattform mittels  
CRISPR/Cas9  
auf Basis einer CHO Zelllinie**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Simon Schröder

aus Westerstede

1. Referent: apl. Prof. Dr. Michael Hust

2. Referent: Prof. Dr. Stefan Dübel

eingereicht am: 05.12.2018

mündliche Prüfung (Disputation) am: 21.02.2019

Druckjahr 2019

### **Veröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor dieser Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

#### **Posterbeiträge**

Schröder, S.; Heine, M.: Generation of a *dhfr* negative CHO cell line for API production with CRISPR/Cas9. (Poster) Himmelfahrtstagung 2018 Magdeburg, Deutschland (2018)

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	7
<i>Abstract</i> .....	8
1. Einleitung.....	9
1.1. Antikörper und Antikörperfragmente .....	9
1.1.1. Rekombinante monoklonale Antikörper .....	9
1.1.2. Antikörperfragmente .....	12
1.2. Zelllinienentwicklung (ZLE).....	14
1.2.1. Aufbau eines Expressionsplasmids.....	14
1.2.2. Das Dihydrofolatreduktase-System.....	16
1.2.3. Alternative Methoden der ZLE.....	17
1.3. Genom-Editierung mittels CRISPR/Cas9 .....	19
1.3.1. Ursprung und Entdeckung .....	19
1.3.2. Anwendung von CRISPR/Cas9 .....	20
2. Zielsetzung.....	22
3. Ergebnisse und Diskussion .....	23
3.1. Zelllinienentwicklung mit Antibiotikumresistenzgenen .....	23
3.2. Entstehung der Produktionsplattform HITB7 .....	24
3.2.1. Death curve mit MTX.....	24
3.2.2. CRISPR/Cas9 Plasmidentwicklung.....	26
3.2.3. Knockout des DHFR Gens .....	28
3.2.4. Zelllinienentwicklung mit grün fluoreszierendem Protein (GFP).....	33
3.2.5. Amplifikationstest des GFP-Gens.....	36
3.3. Zelllinienentwicklung mit DHFR-MTX-System .....	39
3.3.1. Zelllinienentwicklung scFv.....	39
3.3.2. Zelllinienentwicklung Antikörper (Immunglobulin G) .....	51
3.3.3. <i>All-in-one</i> Plasmid für Antikörper.....	55
3.3.4. Vergleich der Plattformen .....	59
4. Ausblick .....	60
4.1. Plasmidoptimierung.....	60

4.2.	Screening .....	60
4.3.	Produktionsplattform .....	63
5.	Material und Methoden .....	64
5.1.	Material .....	64
5.1.1.	Chemikalien und Pufferlösungen.....	64
5.1.2.	Antikörper, Enzyme und Reaktionspuffer .....	65
5.1.3.	Geräte .....	66
5.1.4.	Medien und Zusätze .....	67
5.1.5.	Oligonukleotide .....	67
5.1.6.	Plasmide/Vektoren .....	69
5.1.7.	Reaktionskits/Säulen .....	70
5.1.8.	Verbrauchsmaterialien .....	70
5.1.9.	Zelllinien.....	71
5.1.10.	Software.....	71
5.2.	Methoden.....	72
5.2.1.	Molekularbiologische Methoden .....	72
5.2.1.1.	Planung von Klonierungen und Sequenzierungen.....	72
5.2.1.2.	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	72
5.2.1.3.	DNA-Verdau mittels Restriktionsenzym.....	73
5.2.1.4.	Gelelektrophorese.....	74
5.2.1.5.	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	75
5.2.1.6.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	75
5.2.1.7.	Transformation mittels Hitzeschock.....	76
5.2.1.8.	Kolonie-PCR.....	77
5.2.1.9.	Invitrogen TOPO PCR-Klonierungstechnologie.....	78
5.2.1.10.	Plasmidpräparation .....	78
5.2.1.11.	Bestimmung von DNA-Konzentrationen .....	78
5.2.1.12.	Sequenzierung.....	79
5.2.2.	Zellkulturtechnische Methoden .....	80
5.2.2.1.	Revitalisierung kryokonservierter eukaryotischen Zellen.....	80
5.2.2.2.	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen .....	80

5.2.2.3. Kultivierung von CHO Suspensionszellen .....	80
5.2.2.4. Kultivierung adhärenter HEK293T Zellen .....	80
5.2.2.5. Zellzahlbestimmung mittels Cedex HiRes .....	81
5.2.2.6. Elektroporation (Nucleofektion).....	81
5.2.2.7. Selektion und Amplifikation .....	82
5.2.2.8. Herstellung von konditioniertem Medium.....	82
5.2.2.9. Einzelzellklonierung .....	82
5.2.2.10. Durchflusszytometrie .....	83
5.2.2.11. Batchkultivierung.....	84
5.2.2.12. Fed-Batchkultivierung .....	84
5.2.2.13. Bestimmung der spezifischen Produktivität von Suspensionszellen .....	84
5.2.3. Analytische Methoden.....	86
5.2.3.1. Konzentrationsbestimmung von D-Glukose und L-Laktat .....	86
5.2.3.2. Bestimmung von pH, pO <sub>2</sub> und pCO <sub>2</sub> .....	86
5.2.3.3. Bestimmung der Osmolalität.....	86
5.2.3.4. Gesamtproteinbestimmung mittels Bradford.....	86
5.2.3.5. SDS-PAGE .....	87
5.2.3.6. Größenausschlusschromatographie (SEC) .....	88
5.2.3.7. Protein A-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	89
5.2.3.8. Aktivitätstest eines Antikörpers mittels ELISA .....	89
Literaturverzeichnis.....	90
Abkürzungsverzeichnis.....	101
Abbildungsverzeichnis.....	104
Tabellenverzeichnis.....	106

### Zusammenfassung

Der Markt monoklonaler Antikörper (mAb) ist in Bezug auf Vielfalt und Produktionsmenge in den letzten Jahren stark gewachsen [1]. Um die daraus resultierende steigende Nachfrage nach mAbs bedienen zu können, ist es notwendig gute Produktionsplattformen, die den qualitativen Ansprüchen in ausreichender Quantität gerecht werden, für den Markt bereit zu stellen [2].

Diese Dissertation zeigt, wie mit Hilfe der *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) Methode, durch Ausschalten eines Gens der Wirtszelle, eine Produktionsplattform generiert werden kann, mit der es möglich ist therapeutische Proteine in guter Qualität und ausreichender Quantität herzustellen. Die Produktionsleistung der aus dieser Plattform entstandenen Zelllinien kann durch Zugabe von Methotrexat (MTX), einem reversiblen Inhibitor des Enzyms Dihydrofolatreduktase (DHFR), zu dem Zellkulturmedium, gesteigert werden. Die erreichten Produktivitäten der entstandenen Zellklone bewegten sich dabei im dreistelligen Milligramm-Bereich.

Die der Produktionsplattform zugrundeliegende Zelllinie wurde genetisch durch den Einsatz der CRISPR-Cas9-Methode so verändert, dass sie nicht in der Lage ist das Enzym DHFR, das eine wichtige Rolle in der DNA Synthese spielt, zu exprimieren. Zelllinien, bei denen das DHFR-Gen ausgeschaltet wurde, können nur durch Zugabe von Hypoxanthin und Thymidin (HT) in das Zellkulturmedium proliferieren. Durch die Verwendung eines DHFR-Gens als Selektionsgen, das an ein *gene of interest* (GOI) gekoppelt ist, während einer Zelllinienentwicklung, erlangen die Zellen wieder die Fähigkeit ohne den Zusatz von HT zu überleben. Zusätzlich kann durch Zugabe von MTX zu der Zellkultur erreicht werden, dass sich das DHFR und somit auch das daran gekoppelte GOI amplifiziert. Dadurch kann die Produktivität der entstandenen Produktionszellen gesteigert werden.

Es wurde gezeigt, dass unterschiedliche Transfektionsansätze bei der Produktivität stark variieren (3.2.4), was z.B. durch die Kopienzahl und den Integrationsort zustande kommen kann. Daher ist es für die Entwicklung eines Hochproduzentenzellklons zu empfehlen möglichst viele Transfektionsansätze durchzuführen und eine große Menge an Klonen zu *screenen*.

## ***Abstract***

The market for monoclonal antibodies (mAb) has grown massively in the past decades [1]. To serve the resultant increased demand of mAbs, it is necessary to provide production platforms which fulfill both the high quality and quantity objectives of *active pharmaceutical ingredient* (API) production [2].

This dissertation describes how a production platform was generated with help of the *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) method, with which it is possible to produce therapeutic proteins in a high quality and sufficient quantity. The productivity of production cell lines applying this production platform can be increased by adding methotrexate (MTX), a reversible inhibitor of the enzyme dihydrofolate reductase, to the cultivation media. The productivity of the cell clones achieved by this method lies in a three-digit milligram range.

The cell line of the production platform was genetically modified by the CRISPR/Cas9 method. The dihydrofolate reductase (DHFR) gene was knocked out to prevent cell proliferation without supplementation of the cell culture media with hypoxanthine and thymidine. Because of the usage of a DHFR gene as selection gene, which is linked to a gene of interest (GOI), during the cell line development, the cells regain the ability to grow without the supplement. Furthermore the productivity of these cells can be increased by adding MTX to the cell culture media, which causes a amplification of the DHFR gene and the linked GOI.

The cell line development experiments showed that the productivity of different transfections lead to various productivities, which can be caused by different copy numbers and integration locations. It is therefore important to perform a large number of transfections to get a adequately high producing cell line. This also applies to the number of cell clones which are screened.



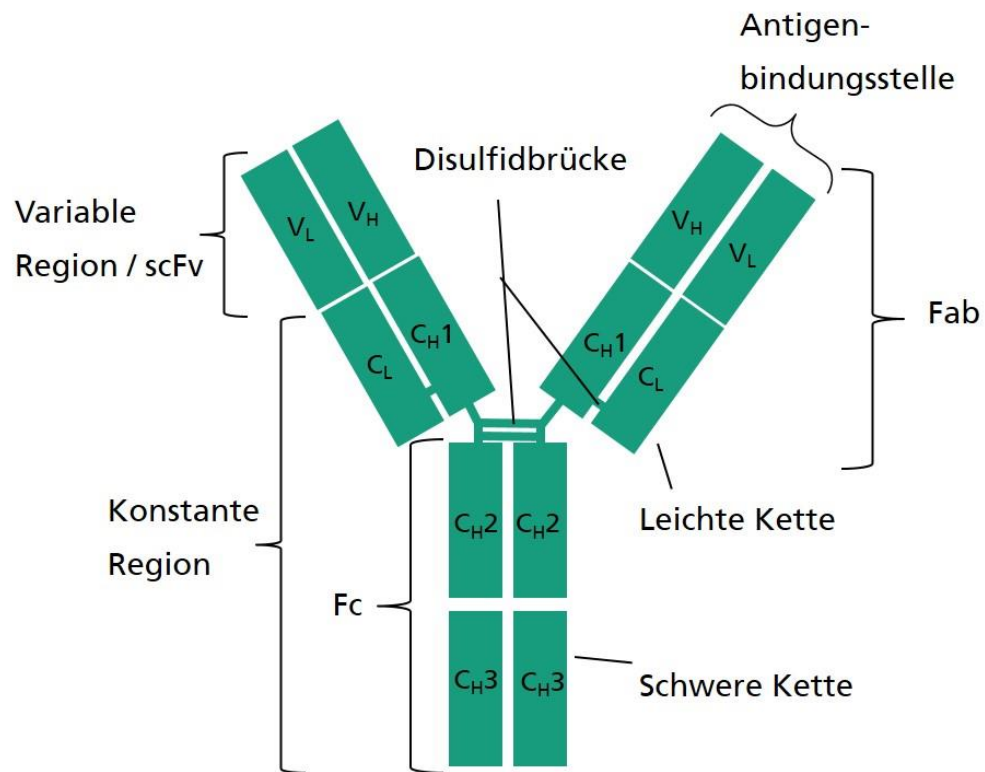
# 1. Einleitung

Die Produktion von therapeutischen Proteinen wird, aufgrund von komplexen Anforderungen, wie z.B. korrekter Faltung und Glykosylierung, oft in eukaryotischen Zellen vorgenommen [3]. Die am häufigsten verwendete Zelllinie ist die *Chinese Hamster Ovary* (CHO) Zelllinie. Sie zeichnet sich durch eine einfache Bearbeitung des genetischen Codes und eine hohe Expression des gewünschten Proteins aus [4]. Eine der wichtigsten Klassen der therapeutischen Proteine sind die monoklonalen Antikörper [5]. Bereits 2008 waren mehr als 30% der Biopharmazeutika in der klinischen Testung rekombinante Antikörper [6].

## 1.1. Antikörper und Antikörperfragmente

### 1.1.1. Rekombinante monoklonale Antikörper

Seit der ersten Zulassung des monoklonalen Antikörpers „Orthoclone OKT3“ im Jahre 1986, ist der Markt rekombinant hergestellter Antikörper zu einem Milliardengeschäft herangewachsen [7]. Antikörper finden aber nicht nur in der modernen Medizin, sondern auch in der Forschung und Diagnostik, Anwendung. Zahlreiche standardisierte Analysemethoden wie der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) oder die Durchflusszytometrie greifen auf monoklonale Antikörper zurück. Um diese Methoden entwickeln zu können, war es notwendig monoklonale Antikörper im großen Maßstab herzustellen. Das erste Herstellverfahren mit dem dies möglich war, war die Hybridomatechnik, die 1975 von César Milstein und Georges Köhler entwickelt wurde [8, 9]. Bei dieser Methode werden nach einer Exposition einer Maus mit einem Antigen die Antikörper produzierenden Zellen aus der Milz der Maus isoliert und mit infinit wachsenden Myelomzellen fusioniert.

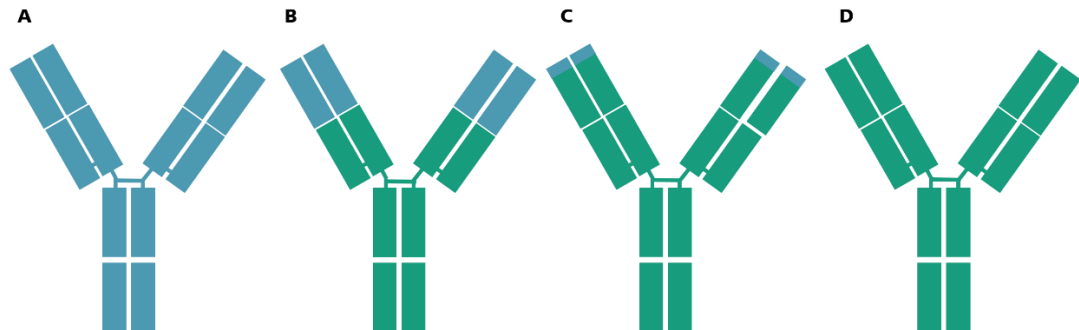


**Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau eines Antikörpers (Immunglobulin G).** Ein Antikörper der Klasse Immunglobulin G (IgG) besteht aus einer schweren und einer leichten Kette. Beide Ketten sind in einen konstanten und einen variablen Teil unterteilt. Der konstante Teil der schweren Kette bildet den crystallisable fragment (Fc)-Teil aus, der als Bindungsstelle des Komplementsystems und zur Opsonierung in-vivo zuständig ist. Die Antigenbindungsstelle, auch Paratop genannt, wird von der variablen Region der schweren und der leichten Kette ausgebildet. H = Heavy; L = light; C = constant; V = variable; scFv = single chain variable fragment; Fab = Fragment antigen binding

So entstanden immortale antikörperproduzierende Hybridzelllinien, die *in-vitro* kultiviert werden konnten. Zwei große Nachteile dieser Methode waren jedoch zum einen, dass keine Antikörper gegen toxische Antigene generiert werden konnten und zum anderen, dass die entstehenden Antikörper einen murinen Ursprung hatten und somit vom menschlichen Immunsystem als körperfremd erkannt und entsprechende Abwehrmaßnahmen eingeleitet wurden [10]. Um dieses Problem beheben und die steigende Nachfrage monoklonalen Antikörpern gegenüber decken zu können, wurden ständig neue Ansätze für die Entwicklung und Produktion von Antikörpern und Antikörperfragmenten erarbeitet.

Ein erster Schritt die Immunogenität des murinen Antikörpers im Menschen zu verringern, war der Austausch des konstanten Teils des Antikörpers durch konstante Regionen humanen Ursprungs [11, 12]. Ein weiterer positiver Effekt war die Verlängerung der Halbwertszeit, die bei murinen Antikörpern im menschlichen Organismus geringer ist, als bei humanen Antikörpern [13]. Die

so entstandenen chimeren Antikörper wurden weiterentwickelt, sodass bei „humanisierten“ Antikörpern nur das Paratop, also die Antigenbindungsstelle (*complementarity determining region*, CDR) murinen Ursprungs ist [14].

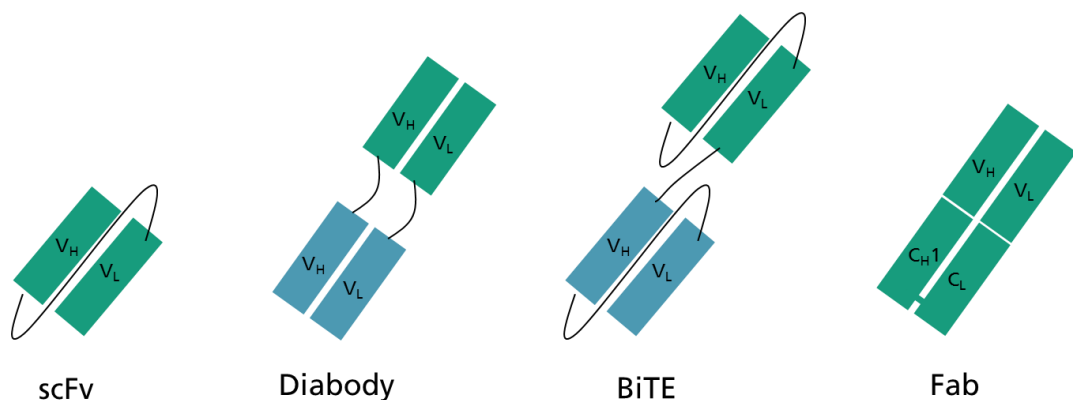


**Abbildung 1-2: Arten von Antikörpern.** (A) Muriner Antikörper (B) Chimärer Antikörper. Nur die variable Domäne ist murinen Ursprungs. (C) Humanisierter Antikörper. Nur die Antigenbindungsstelle ist murinen Ursprungs. (D) Humaner Antikörper

Vollständig humane Antikörper werden heute weitestgehend durch *phage display* und humanisierte Mausmodelle entwickelt und rekombinant in eukaryotischen Zellkulturen hergestellt. Den Grundstein für das *phage display* legte George P. Smith 1985 [15], indem er Fremd-DNA in das Genom filamentöser Phagen einfügte, die das Protein des Fremdgens auf ihrer Oberfläche gebunden präsentieren. Nach dem gleichen Prinzip können auch variable Regionen von Antikörpern auf den Phagen gebunden werden, dessen Gene zuvor aus antikörperbildenden Zellen gewonnen wurden. Die Methode des *Phagen-Display* wurde zeitgleich an unterschiedlichen Orten, u.a. von Breitling und Dübel et al weiterentwickelt [16–18]. Inzwischen gibt es Phagen-Bibliotheken mit mehr als  $10^{10}$  unterschiedlichen Antikörperfragmenten, die, z.B. von der YUMAB GmbH aus Braunschweig, bei der Suche nach spezifischen Sequenzen zu bestimmten Antigenen eingesetzt werden [19]. Die so ausgewählten Antikörper können, z.B. durch fehlerhafte Polymerasekettenreaktion, verändert und optimiert werden [20, 21]. 2002 wurde der erste humane Antikörper „Adalimumab/Humira“, der mit der Phagen-Display Methode entwickelt wurden, zugelassen [22]. Stand 2017 sind bereits sechs durch phage display entwickelte Antikörper in der Anwendung und 60 in der klinischen Prüfung [23].

### 1.1.2. Antikörperfragmente

Neben Antikörpern, rücken auch Antikörperfragmente immer mehr in den Fokus der Wissenschaft und Medizin. Durch Abtrennen des Fc-Teils eines Antikörpers entstehen Fab-Fragmente, die neben der variablen Region auch Domänen der konstanten Region enthalten. Werden die verbleibenden konstanten Domänen ebenfalls entfernt, so erhält man Fragmente (scFv), die lediglich aus der variablen Region des Antikörpers bestehen [24]. Fragmente dieser Art mit unterschiedlichen Spezifitäten können mit Polypeptidketten (*linker*) verbunden werden, wodurch bispezifische Antikörperfragmente (*diabody*) entstehen. Ist eines der beiden Fragmente spezifisch gegen einen T-Zellrezeptor (CD3) gerichtet, so spricht man von *Bi-specific T-cell engagers* oder BiTE-Antikörpern. Diese Moleküle sind in der Lage das körpereigene Abwehrsystem gegen ein bestimmtes Antigen zu richten.



**Abbildung 1-3: Gängige Antikörperfragmente.** Single chain Fragment variable (scFv) bestehen nur aus der variablen Region eines Antikörpers. Die beiden Domänen  $V_H$  und  $V_L$  sind über einen Linker miteinander verbunden. Diabodies bestehen aus zwei variablen Regionen mit unterschiedlichen Spezifitäten. Bi-specific T-cell engagers (BiTEs) sind eine spezielle Form der Diabodies. Eine variable Region ist dabei immer spezifisch für ein Oberflächenprotein einer T-Zelle. Dem Fab-Fragment fehlt gegenüber dem IgG-Antikörper der crystallisable fragment (Fc) Teil.

Da Antikörperfragmente ein kleineres Volumen als Antikörper besitzen, weisen sie eine bessere Gewebedurchdringung auf, was gerade bei der Behandlung von Tumoren eine wichtige Eigenschaft darstellt [25]. Ein weiterer Vorteil der geringen Größe ist, dass Antikörperfragmente schwer zugängliche Epitope, wie zum Beispiel aktive Regionen von Enzymen, erreichen können [26]. Im Gegensatz zu Antikörpern, die *in-vivo* zusätzlich durch einen Recycling-Mechanismus (*neonatal Fc receptor-mediated recycling*) geschützt sind [27, 28], werden Antikörperfragmente von der Niere aktiv aus dem Blut gefiltert. Ihre dadurch resultierende geringe Halbwertszeit im Blut [29] kann

je nach Anwendung einen positiven aber auch einen negativen Effekt auf die Behandlung haben. Ist für eine Behandlung eine lange Halbwertszeit im Blut gefordert, so kann diese durch Anhängen von Polyethylenglycolketten (PEGylierung) oder von bestimmten Aminosäuren (PASylierung), an die Antikörperfragmente, verlängert werden [30].

Die oben genannten Vorteile von Antikörperfragmenten können zum Beispiel bei der bildlichen Erfassung und Behandlung von Tumoren *in vivo* zum Einsatz kommen. Radioaktiv markierte monoklonale Antikörper, die sich an einen Tumor anlagern sollen, um diesen zu markieren oder zu zerstören, können durch die hohe Halbwertszeit gesundes Gewebe schädigen. Die Verwendung von Antikörperfragmenten schont durch die geringe Halbwertszeit im Blut das umliegende Gewebe und führt gleichzeitig durch die bessere Durchdringung des Tumor zu einem höheren Kontrast bei der bildlichen Erfassung [31] bzw. zu einem besseren Wirkungsgrad im Tumorräumen [32].

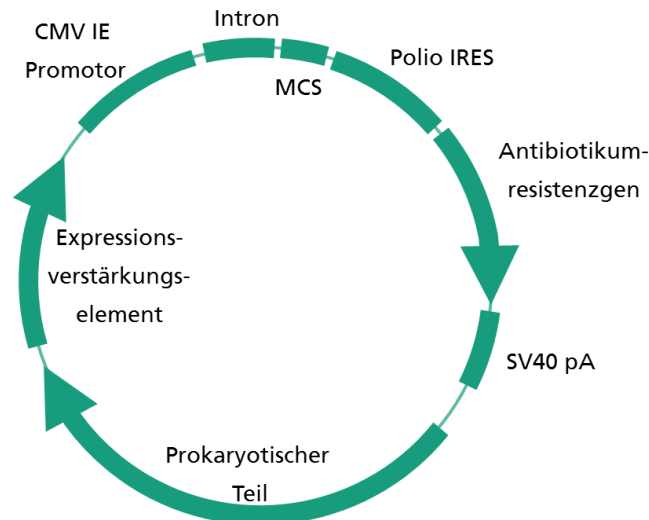
## 1.2. Zelllinienentwicklung (ZLE)

Am Anfang eines Antikörper-Produktionsprozesses steht die Zelllinienentwicklung. Eine infinit wachsende Zelllinie wird durch das Einfügen des *gene of interest* (GOI) dazu gebracht das gewünschte Protein zu exprimieren. Das GOI wird dafür zunächst in eine Expressionskassette eines Plasmids eingefügt. Eine Zelllinie, die sich durch unterschiedliche Eigenschaften als bevorzugter Produktionsorganismus herausgestellt hat, ist die *chinese hamster ovary* (CHO) Zelllinie. Erstens hat diese Zelllinie die Fähigkeit in Suspension und in serumfreien, chemisch definiertem Medium zu wachsen, was für großvolumige Produktionsprozesse unter GMP-Bedingungen unverzichtbar ist. Zweitens gibt es nur wenige humane Viren, die sich in dieser Zelllinie replizieren können, was zu einem geringeren Risiko für den Menschen beiträgt [33], der das Protein aus therapeutischen Zwecken verabreicht bekommen soll. Und drittens ähneln die Glykosylierungsmuster, die von der CHO Zelle generiert werden, dem menschlichen Glykosylierungsmuster, sodass eine Bioaktivität im Menschen gewährleistet und eine mögliche Immunantwort auf den Antikörper unwahrscheinlich ist [34].

### 1.2.1. Aufbau eines Expressionsplasmids

Die Zelllinienentwicklung beginnt mit der Klonierung, also dem Einfügen des GOIs in ein Expressionsplasmid. Das Expressionsplasmid besteht aus einem prokaryotischem und einem eukaryotischem Teil, wobei der prokaryotische Teil der Vervielfältigung des Plasmids in E.coli-Bakterien dient und aus einem *origin of replication* (ORI) und einer Antibiotikumresistenz besteht. Die ORI-Sequenz ist der Startpunkt der Replikation des Plasmids im Bakterium und die Antibiotikumresistenz dient der Selektion.

Der eukaryotische Teil kann unterschiedlich aufgebaut sein. Am Beispiel des, in dieser Arbeit, verwendeten Plasmids werden hier die wichtigsten Sequenzen beschrieben (**Abbildung 1-4**).



**Abbildung 1-4 Aufbau eines Expressionsplasmids.** Eine Promotor/Enhancer-Region des Cytomegalievirus exprimiert das gene of interest, dass in die multiple cloning side (MCS) eingefügt wird. Ein Antibiotikumresistenzgen ist über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) an das GOI gekoppelt. Diese Expressionskassette wird durch ein Polyadenylierungssignal (pA) eines Simian-Virus 40 (SV40) abgeschlossen. Das Expressionsverstärkungselement war Teil einer dieser Promotion vorangegangenen, Masterarbeit.

Die Expression wird durch einen Promotor des Cytomegalievirus initiiert, der eine *immediate-early* (IE) Enhancersequenz beinhaltet, die zu einer guten Expression beitragen soll [35]. Einer intronischen Sequenz, die ebenfalls zu einer guten Expression beitragen soll [36–38], folgt die *multiple cloning side* (MCS), in der das GOI eingefügt werden soll. Die MCS ist eine Sequenz die viele Restriktionsschnittstellen beinhaltet, die das Einfügen des GOI vereinfachen soll. Über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) ist das Selektionsgen, in diesem Fall eine Antibiotikumresistenz, gekoppelt. Das GOI wird verbunden durch die IRES-Sequenz auf einer mRNA mit dem Antibiotikumresistenzgen transkribiert. Somit wird gewährleistet, dass Zellen, die gegen das Selektionsantibiotikum resistent sind auch das GOI exprimieren. Nach der erfolgreichen Selektion der Zellen mit dem Antibiotikum, wird eine Einzelzellklonierung vorgenommen, bei der möglichst viele Zellklone auf Ihre Produktivität, Wachstum und die Funktionalität des Proteins untersucht werden sollen. Jeder Klon weist nach der Selektion eine spezifische Produktivität auf, die von der Anzahl der integrierten Plasmide und dem Integrationsort abhängt. Die Expression bei dieser Art der Zelllinienentwicklung kann nach der Selektion nicht weiter gesteigert werden.

### 1.2.2. Das Dihydrofolatreduktase-System

Eine Methode, um die Expression nach der Selektion zu steigern, ist die Verwendung des Dihydrofolatreduktase (DHFR)-Systems. Bei dieser Methode wird ein Dihydrofolatreduktasegen als Selektionsgen eingesetzt. Nach der Selektion kann, durch Zugabe der Chemikalie Methotrexat (MTX) zum Zellkulturmedium, die Kopienzahl des GOIs in der Zelle erhöht werden, wodurch es zu einer Steigerung der Expression kommt.

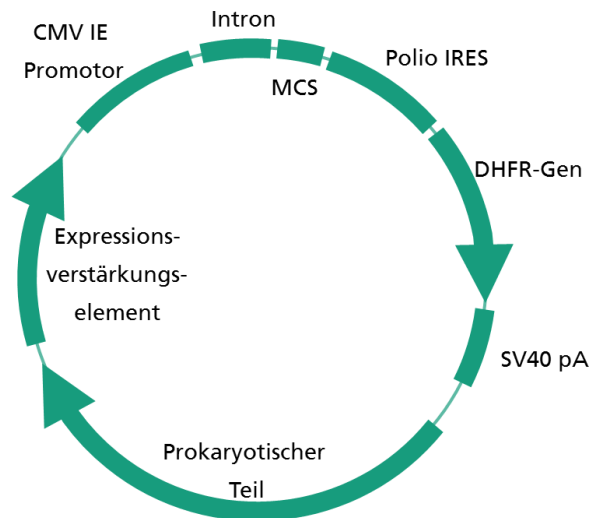
MTX hat seinen Ursprung in der Krebstherapie und hemmt das für die Zellen lebenswichtige Enzym DHFR kompetitiv [39]. Die Dihydrofolatreduktase katalysiert die Reaktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat, welches essenziell für die Synthese von Purin, dem Grundbaustein der DNA-Basen Adenin und Guanin ist [40]. Bei der Behandlung von Krebspatienten mit MTX wurde beobachtet, dass die Krebszellen nach einer gewissen Behandlungszeit eine Immunität gegen das MTX aufwiesen. Auch eine Erhöhung der Dosis führte nicht zum gewünschten Ziel und resultierte nach einiger Zeit erneut in einer Immunität. Bei genauerer Untersuchung dieses Phänomens wurde herausgefunden, dass die Zellen mit einer Amplifikation des DHFR-Gens, und der damit einhergehenden Expressionssteigerung des DHFR-Enzyms, auf das MTX reagieren [41–43]. Bei der Amplifikation wird jedoch nicht nur das DHFR-Gen selbst amplifiziert, sondern ebenso eine Region von bis zu 100-10.000 Kilobasenpaare der umliegenden DNA [44, 45]. Die amplifizierten Gene können dabei sowohl extrachromosomal in *double minutes* (DM), also auch intrachromosomal als *homogeneously staining regions* (HSR) vorliegen [46]. Bei CHO Zellen findet die Amplifikation fast ausschließlich in Form von HSR statt [44, 47].

Die Erkenntnisse über die MTX-DHFR-Beziehung können in der Zelllinienentwicklung genutzt werden, um die Produktivität einer Produktionszelllinie nach der Selektion weiter zu steigern.

Voraussetzung für die Verwendung des DHFR-Systems ist eine CHO Zelllinie, bei der die genomische DHFR-Expression ausgeschaltet ist. Diese Zelllinie ist, aufgrund der fehlenden Dihydrofolatreduktase, nur durch Zugabe von Hypoxanthin und Thymidin (HT) in das Zellkulturmedium lebensfähig. Das



Ausschalten des genomischen DHFR ist notwendig, um zu verhindern, dass dieses bei der Zugabe von MTX amplifiziert wird.



**Abbildung 1-5 Aufbau eines Expressionsplasmids mit DHFR als Selektionsgen.** Der Aufbau entspricht dem Aufbau des Plasmids in **Abbildung 1-4 Aufbau eines Expressionsplasmids**. Das Selektionsgen ist in diesem Fall ein Dihydrofolatreduktasegen.

Die Selektion der transfizierten Zellen geschieht durch die Abwesenheit des HT-Zusatzes. Zellen, die das Plasmid nicht integriert haben, und so nicht in der Lage sind DHFR zu exprimieren, sterben ab. Durch Zugabe von Methotrexat nach der Selektion kann das DHFR und somit auch das über eine interne ribosomale Eintrittsstelle daran gekoppelte GOI amplifiziert werden.

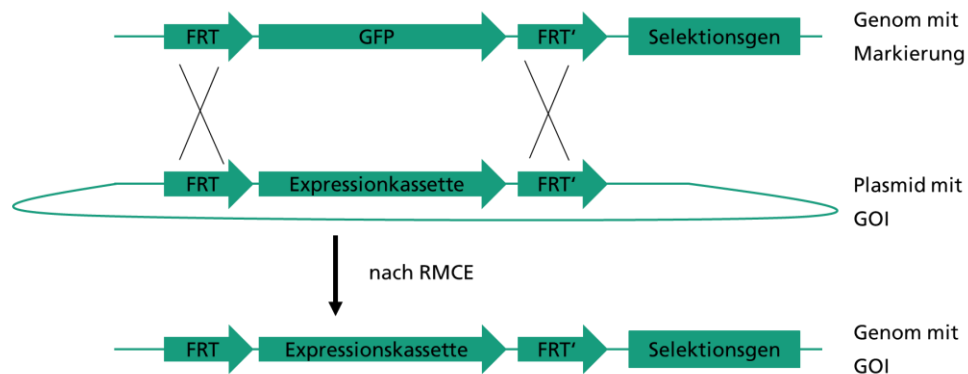
### 1.2.3. Alternative Methoden der ZLE

Neben den bereits genannten herkömmlichen Zelllinienentwicklungsmethoden gibt es noch weitere vielversprechende oder auch schon anwendungsreife Ansätze, um Zelllinien zu generieren, die in einem hohen Maße ein Produkt exprimieren. Ziel dabei ist es die zeit- und kostenintensive Zelllinienentwicklung (ZLE) zu vereinfachen und zu optimieren. All diese Ansätze konnten die herkömmliche Methode jedoch noch nicht ablösen.

Die Verwendung von viralen Vektoren ist ein Ansatz, der bereits zur Anwendung kommt. Das GOI wird dabei z.B. von lentiviralen Partikeln in die Zelle eingebracht [48]. Der Vorteil ist, dass die viralen Partikel ihr Genom nicht wie bei der herkömmlichen ZLE zufällig in das Wirtsgenom integrieren [49, 50], sondern aktive Regionen des Genoms ansteuern [51]. So wird eine starke und vor allem stabile Expression begünstigt.

Ein anderer Ansatz basiert auf einer gerichteten Integration des GOIs und der entsprechenden Expressionskassette in das Genom der Wirtszelle. Für die Integration wird ein Doppelstrangbruch an einer gewünschten Stelle des Wirtsgenoms vorgenommen. Dieser Doppelstrangbruch kann z.B. durch *transcription activator-like effector nuclease* (TALENs) [52, 53], Zinkfinger-nukleasen (ZFN) [54] oder *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) hervorgerufen werden [55]. Ein Plasmid mit einer Expressionskassette, die von zwei zu dem Integrationsort homologen Sequenzen flankiert ist, wird ebenfalls in die Wirtszelle transfiziert. Durch die Homologie dieser Regionen, kann es zu einer Integration der Plasmid-DNA in das Genom der Wirtszelle kommen [56, 57].

Ein Ansatz, der auch am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin in der Abteilung der Pharmazeutischen Biotechnologie in Form einer Dissertation [58] untersucht wurde ist der Rekombinase-vermittelte Kassettenaustausch, engl. *recombinase-mediated cassette exchange* (RMCE). Hierbei können durch die Rekombinase Flp genetische Regionen, die von *Flp-recombinase target* (FRT) Regionen flankiert sind, ausgetauscht werden [59].



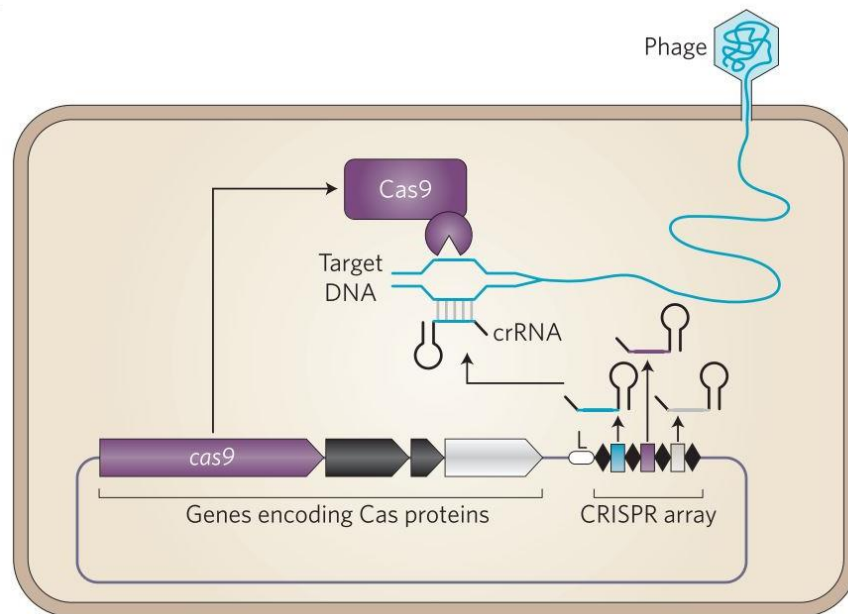
**Abbildung 1-6: Schematische Darstellung des Kassettenaustausches [60].** Das von den beiden unterschiedlichen FRT-Sequenzen markierte GFP im Genom der Zelle kann durch die Expressionskassette auf dem Plasmid ausgetauscht werden.

Das Genom der Zellen, bei denen dieses Verfahren angewandt werden soll, muss zunächst mit FRT-Sequenzen markiert werden. Oft wird dabei ein visueller Marker, wie z.B. grün fluoreszierendes Protein (GFP) als Indikator der Expression eingesetzt [61]. Die Zellen mit höchsten Fluoreszenzintensität werden dann ausgewählt, um einen Austausch des GFPs durch ein *gene of interest* (GOI) vorzunehmen.

### 1.3. Genom-Editierung mittels CRISPR/Cas9

#### 1.3.1. Ursprung und Entdeckung

Durch den evolutionären Wettlauf zwischen Prokaryonten und Phagen bzw. Viren, die auf Bakterien als Wirtszellen spezialisiert sind, sind im Laufe der Zeit auf Seiten der Bakterien unterschiedlichste Abwehrmechanismen entstanden [62]. Einer dieser Mechanismen besteht aus einer genomischen Region in der virale Gensequenzen ablegt und als Erkennungssequenzen für spätere Abwehrmaßnahmen gespeichert werden. Diese Sequenzen werden *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) genannt. Sie werden in Form von kurzen Ribonukleinsäureketten sogenannter *guide* RNA (gRNA) exprimiert und können sich mit speziellen Endonukleasen (z.B. Cas9) verbinden und diese zu zellfremder Phagen-DNA leiten (**siehe Abbildung 1-7**). Die gRNA besteht aus einem zu der Zielsequenz komplementären Teil und einem Sequenzmotiv, dass *protospacer adjacent motif* (PAM) genannt wird, an welchem das Cas9-Enzym bindet [63].



**Abbildung 1-7: Ablauf der Abwehrreaktion eines Bakteriums bei einer Infektion durch eine Bakteriophage.** [64] Über eine DNA-Sequenzdatenbank (CRISPR) werden guide RNA-Fragmente (gRNA), auch CRISPR RNA (crRNA) genannt, exprimiert, die komplementär zu Regionen des Phagenoms sind und zeitgleich an Endonukleasen (Cas9) binden können. So werden die Endonukleasen zu einer bestimmten Stelle des Phagenoms geleitet, um dort einen Schnitt in der DNA hervorzurufen.

Durch die Möglichkeit, neue Sequenzen in die CRISPR-Bibliothek aufnehmen zu können, handelt es sich hierbei um eine adaptive Immunität [65]. Die erste

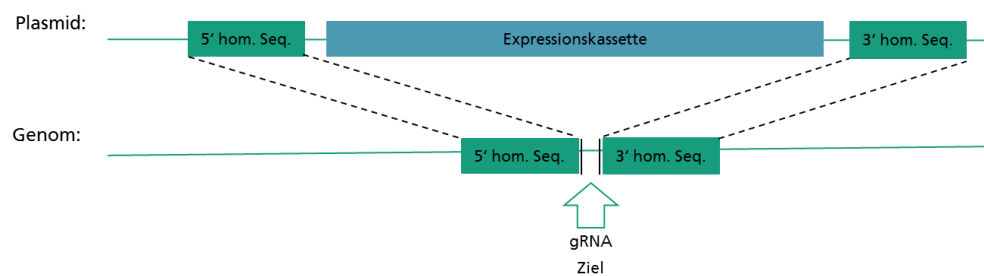
Entdeckung der heute unter dem Namen CRISPR bekannten Region in *E.coli* wurde im Jahr 1987 von Yoshizumi Ishino et al. beschrieben [66]. In den darauf folgenden Jahren wurden ähnliche Sequenzen in unterschiedlichsten Mikroorganismen entdeckt und 2002 zum ersten Mal unter dem Namen CRISPR zusammengefasst [67]. Die ersten Zusammenhänge zwischen der CRISPR-Region und einer Abwehr gegen Bakteriophagen wurde 2005 von Mojica et al. beschrieben [68]. Die Hypothese, dass es sich um eine adaptive Immunität handelt, wurde später bestätigt [69].

### 1.3.2. Anwendung von CRISPR/Cas9

Das Verändern von genomischer DNA *in vivo* war bereits vor der Verwendung der CRISPR/Cas9-Methode durch *zinc-finger* Nukleasen (ZFNs) und *transcription activator-like effector nuclease* (TALEN) Proteine möglich. Die Durchführung dieser Methoden ist jedoch sehr aufwendig, da für jeden Ansatz neue Proteine entwickelt und getestet werden müssen [55]. Bei der CRISPR/Cas9-Methode muss lediglich eine geeignete DNA Sequenz ausgewählt werden und in ein Plasmid eingefügt werden, das neben der so entstehenden gRNA auch das Cas9 Enzym exprimiert [70]. So können sowohl Bakterien, als auch tierische und pflanzliche Zellen genetisch verändert werden.

Der durch die Endonuklease hervorgerufene Doppelstrangbruch im Genom der Zielzelle kann im Wesentlichen durch zwei Reparaturmechanismen behoben werden. Zum einen durch einen homologen Reparaturmechanismus (HDR = *homology directed repair*), der hauptsächlich in der S-Phase des Zellzykluses vorkommt, da zu diesem Zeitpunkt das Schwesterchromatin vorliegt [71], auf dem dieselbe Gensequenz abgespeichert ist. Die Reparatur geschieht in diesem Fall meistens durch homologe Rekombination und führt so zu einer vollständigen Wiederherstellung der Funktion der betroffenen Gensequenz [72]. Bei dem zweiten Reparaturmechanismus handelt es sich um eine nicht-homologe Methode (NHEJ = *non-homologous end joining*) [73]. Hierbei werden die beiden Enden des Schnitts ohne Abgleich ligiert. Dabei können Basenpaare eingefügt werden oder verloren gehen. Bereits durch Addition oder Deletion eines Basenpaares ändert sich das Leseraster des Gens, wodurch eine Proteinsequenz entsteht, die nicht funktional ist.

CRISPR/Cas kann aber auch, wie bereits unter **1.2.3** angedeutet, für eine gerichtete Integration einer Expressionskassette in das Genom einer Zelllinie eingesetzt werden. Bei dieser Methode wird neben dem Plasmid, welches das Cas-Enzym und die gRNA exprimiert, ein Plasmid in die Zelle transfiziert, dass eine Expressionskassette enthält. Diese Kassette wird flankiert von zwei Sequenzen, die homolog zu der Region der genomischen DNA ist, in die das Konstrukt integriert werden soll [74]. Durch den Doppelstrangbruch, der durch das Cas-Enzym hervorgerufen wird, wird der Reparaturmechanismus eingeleitet, der auf Homologie basiert (HDR). So wird, wie in **Abbildung 1-8** skizziert ist, die Expressionskassette in das Genom der Zelle eingebaut.



**Abbildung 1-8: Ortsspezifische Integration einer Expressionskassette in das Genom der Wirtszelle.** Die Expressionskassette ist von zwei Sequenzen flankiert, die homolog zu Regionen der genomischen DNA ist, in die das Konstrukt integriert werden soll. Durch einen Doppelstrangbruch, der durch die gRNA und dem Cas-Enzym hervorgerufen wird, kommt es zu einer homologiegesteuerten Reparatur, bei der die Expressionskassette in das Genom eingefügt wird.

Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass nicht wie bei anderen ortsspezifischen Integrationsmethoden, wie Cre/loxP oder Flp/FRT, eine Plattformzelllinie entwickelt werden muss [75, 76], sondern jede Zelllinie ohne Vorbereitung eingesetzt werden kann.

Eine weitere Möglichkeit CRISPR/Cas anzuwenden, ist die CRISPR-interferenz, die zur Regulierung der Genexpression *in vivo* eingesetzt werden kann. Hierbei wird ein Cas-Enzym eingesetzt, dass keine Nukleaseaktivität besitzt [77]. Durch die gRNA wird das inaktive Enzym an die gewünschte Stelle im Genom der Zelle geleitet und sorgt dort durch sterische Hinderung für eine Blockade der Expression. Im Gegensatz zu anderen expressionshindernden Methoden wie der RNA-Interferenz, die sich an die mRNA anlagert und so eine Translation stört [78], hindert die CRISPR-Interferenz die Transkription [79].

## 2. Zielsetzung

Für die kommerzielle Produktion von *active pharmaceutical ingredients* (APIs) ist es unabdingbar die Rechte an einer zuverlässigen Produktionsplattform auf Basis einer eukaryotischen Zelllinie zu halten. Aus diesem Grund soll im Laufe der nächsten Jahre am Fraunhofer ITEM in Braunschweig eine optimierte Produktionsplattform generiert werden, die von der Zelllinienentwicklung bis zum Produktionsprozess aufeinander abgestimmt ist. Der Grundstein dieser Arbeit wurde in einer Masterarbeit „Generierung einer Produktionsplattform zur Herstellung von APIs“ [80] gelegt. Hierbei ist eine Produktionsplattform auf Basis einer CHO Suspensionszelllinie entstanden, die eine Expression von APIs mit Hilfe einer Selektion mittels Antibiotikaresistenzgenen ermöglicht.

In dieser Promotion soll diese Plattform weiterentwickelt und den gängigen ZLE-Methoden angepasst werden. Zeitgleich soll in einer weiteren Promotionsarbeit ein Produktionsprozess auf die in dieser Arbeit entstandenen Zelllinien abgestimmt werden.

Ziel dieser Promotion ist es mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Knockoutsystems eine Dihydrofolatreduktase (DHFR) negative CHO Zelllinie zu generieren. Diese Zelllinie soll Basis einer API-Produktionsplattform werden, mit der es möglich ist die Produktivität mit Hilfe von Methotrexat (MTX) nach der Selektion zu steigern. Für das Ausschalten des DHFR Gens in der CHO Zelllinie soll ein Knockoutplasmid generiert werden, das neben dem Cas9 Enzym, welches einen Doppelstrangbruch im Wirtsgenom hervorrufen kann, spezifische „guide“ RNA, exprimiert, die das Enzym zum gewünschten Ort führt. Der Knockout soll molekularbiologisch durch Sequenzierung der Zielregion nachgewiesen werden.

Um die Funktionalität der neu generierten Plattform in Bezug auf die Genamplifikation und die damit einhergehende Steigerung der Produktivität zu beweisen, sollen verschiedene Produkte mit Hilfe der Plattform hergestellt werden. Die erreichten Produkttiter sollen mit der Literatur verglichen und die Funktionalität der Produkte bewiesen werden. Als Testprodukte sollen sowohl ein Antikörper, als auch ein Antikörperfragment dienen.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Zelllinienentwicklung mit Antibiotikaresistenzgenen

Im Zuge einer dieser Doktorarbeit vorangegangenen Masterarbeit wurde eine CHO basierte API-Produktionsplattform „HIT-Plattform“ am Fraunhofer ITEM in Braunschweig generiert. Die Selektion der Zelllinienentwicklung dieser Plattform wurde mit Hilfe von Antibiotikaresistenzgenen, die auf dem Expressionsplasmid mit dem *gene of interest* (GOI) verknüpft waren, vorgenommen. Auf Basis dieser Produktionsplattform wurden diverse Zelllinien, die z.B. Antikörper, Antikörperfragmente oder andere therapeutische Proteine exprimieren, entwickelt. Um die neue, in dieser Promotionsarbeit entstehende Produktionsplattform mit der Vorherigen vergleichen zu können, wurden Produkte aus bestehenden Projekten des Fraunhofer ITEM ausgewählt und mit beiden Produktionsplattformen exprimiert.

Die Zelllinienentwicklung mit der HIT-Plattform beginnt mit der Klonierung des GOI in das Expressionsplasmid der Plattform. Als Selektionsgen kann zwischen Hygromycin und Geneticin gewählt werden. Das generierte Expressionsplasmid wird in die HIT-CHO Zelllinie transfiziert und eine Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum durchgeführt. In einem einfachen Batch- oder Fed-Batch-Versuch wird der produktivste Transfektionsansatz ausgewählt und anschließend eine Einzelzellklonierung durchgeführt. In einem weiteren Fed-Batch-Versuch wird dann ein Klon mit einer guten Produktivität und einem guten Wachstumsverhalten ausgewählt, wobei die Aktivität des Produktes ebenfalls gegeben sein muss. In der folgenden Tabelle sind die so generierten Ergebnisse dargestellt.

**Tabelle 3-1 Erreichte Produktkonzentrationen mit den entwickelten HIT-Zelllinien.**

	<b>Pool*</b> Produkt / (mg/L)	<b>Klon</b> Produkt / (mg/L)
scFv-Fragment	48	261
Antikörper	41	946

(\*) Diese Daten entstammen einem Batchversuch, während die Daten der Klone durch einen Fed-Batch Prozess generiert wurden

Die Zellpools erreichen mit beiden Produkten eine Produktkonzentration zwischen 40 und 50 mg/L. Bei diesem Produktionsprozess handelte es sich um einen einfachen Batchversuch. Die Klone hingegen wurden in einem Fed-Batch-Versuch getestet. Bei diesem Prozess werden durch die Zuführung von Nährstoffen während des laufenden Prozesses höhere Zellkonzentrationen und Produkttiter erreicht.

In der Literatur sind Produktionsprozesse mit stabil exprimierenden CHO-Zelllinien bekannt, die mehrere Gramm pro Liter [81–83] eines Antikörpers produzieren. Bei diesen publizierten Zelllinienentwicklungen wurde jedoch eine wesentlich höhere Anzahl an Zellklonen auf Ihre Produktivität getestet, wodurch die Wahrscheinlichkeit einen besonders gut produzierenden Zellklon zu isolieren, ebenfalls wesentlich höher ist. Das *screening* wird später in dieser Arbeit noch weiter behandelt und im **Ausblick** ausführlich diskutiert.

### 3.2. Entstehung der Produktionsplattform HITB7

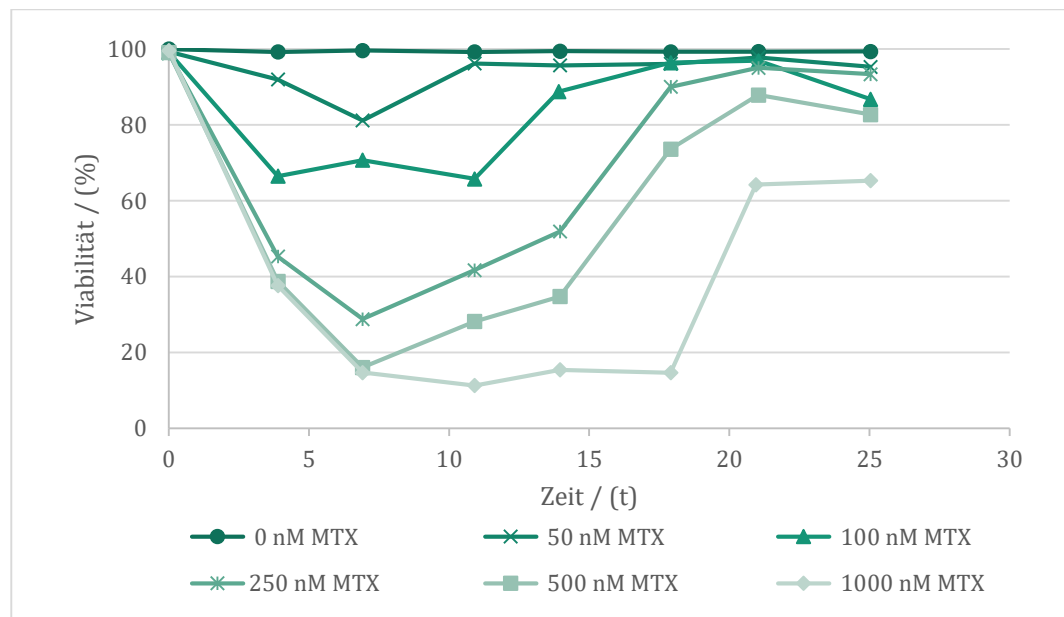
Ein Nachteil bei der Fraunhofer-eigenen HIT-Plattform ist, dass eine Steigerung der Produktivität nach der Selektion nicht möglich ist. Durch den Integrationsort und die Kopienzahl des Plasmides im Genom der CHO Zelle ist die Produktivität der Zelle festgelegt. Im Vergleich dazu besteht bei der Verwendung des DHFR-Systems die Möglichkeit der Amplifikation des Plasmids bzw. des GOIs im Wirtsgenom (**siehe 1.2.2**). Bei diesem Expressionssystem muss jedoch zunächst das Dihydrofolatreduktasegen der CHO-Zelllinie ausgeschaltet werden.

#### 3.2.1. Death curve mit MTX

Die Amplifikation des GOIs im Genom der Wirtszelle setzt eine Sensitivität der Zelllinie dem MTX gegenüber voraus. In der Literatur wird beschrieben, dass neben der DHFR-Amplifikation noch weitere Faktoren eine Immunität gegen MTX hervorrufen können. So wurden bereits 1987 Untersuchungen mit fluoreszenzmarkiertem MTX durchgeführt, die Membranmutationen identifizierten, die den Transport von MTX durch die Zellmembran verhindern [84]. Eine weitere Anomalie, die eine Immunität nach sich zieht, ist eine nicht vorhandene oder sehr schwache Sensitivität der Dihydrofolatreduktase dem MTX gegenüber [85]. Um diese beiden Möglichkeiten der Immunität im Vorfeld



ausschließen zu können, wurde mit den HIT-CHO-Zellen eine *kill curve* mit unterschiedlichen MTX-Konzentrationen (0nM, 50nM, 100nM, 250nM, 500nM und 1000nM) aufgenommen. Hierfür wird das MTX in unterschiedlichen Konzentrationen auf Zellkulturen der CHO Zelllinie gegeben und deren Viabilität beobachtet. Eine Immunität der HIT-Zellen gegenüber dem MTX würde die Amplifikation des GOIs und so die Steigerung der Expression verhindern.



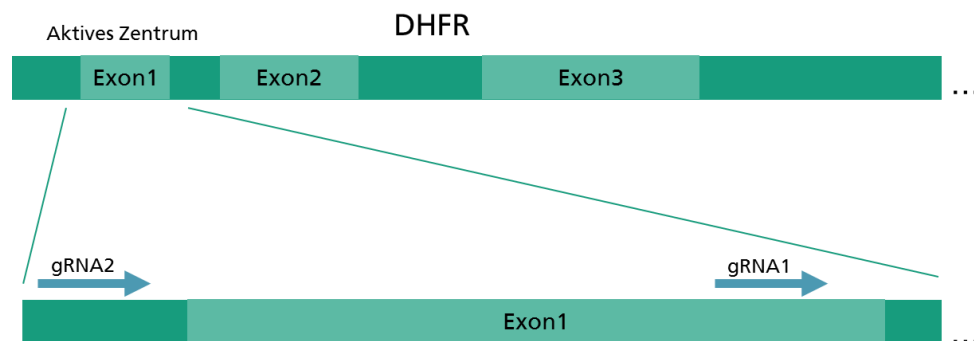
**Abbildung 3-1: Kill curve der HIT-CHO-Zelllinie mit MTX.** Die Viabilität nimmt bei allen mit MTX behandelten Kulturen zunächst ab. Der Grad der Abnahme hängt dabei von der Konzentration des MTX in dem Zellkulturmedium ab. Nach dem Erreichen eines Tiefpunkts der Viabilität steigt diese wieder an.

Die *death curve* zeigt bei allen mit MTX behandelten Kultivierungen eine Abnahme der Viabilität. Der Grad der Abnahme steigt dabei wie erwartet mit Zunahme der MTX-Konzentration. Nach etwa 20 Tagen bewegt sich die Viabilität der Kulturen mit 50nM, 100nM und 250nM MTX bereits wieder in einem Bereich über 90%. Die Zellkulturen mit den hohen Konzentrationen 500nM und 1000nM konnten sich ebenfalls erholen. Der Anstieg der Viabilität ist durch die Amplifikation des DHFR-Gens innerhalb der CHO Zellen zu erklären. Um die Amplifikation und die damit einhergehende Expressionssteigerung zu beweisen, hätte hier die mRNA Konzentration bestimmt werden können. Dies wäre z.B. über die Northern-Blot-Methode möglich gewesen.

Der Verlauf der *death curve* schließt die zuvor genannten alternativen MTX-Resistenzen aus. Sowohl die Membrangängigkeit, als auch die Sensitivität der CHO Zellen gegenüber dem MTX sind gegeben. Letzteres ist für den weiteren Verlauf der Arbeit nicht von Bedeutung, da das DHFR-Gen der CHO Zelle ausgeschaltet werden soll.

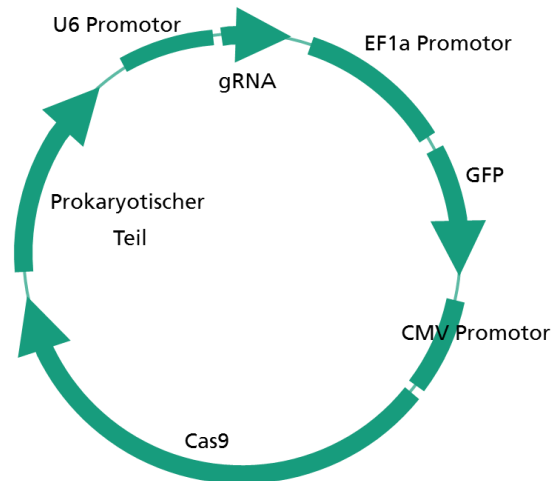
### 3.2.2. CRISPR/Cas9 Plasmidentwicklung

Um das Dihydrofolatreduktasegen (DHFR) der HIT-Zelle auszuschalten, wurde die CRISPR/Cas9-Methode angewandt. Mit dieser Methode kann ein Doppelstrangbruch an einer spezifischen Stelle des Wirtsgenoms hervorgerufen werden, der durch einen nicht-homologen Reparaturmechanismus (*non-homologous end-joining*) zu einer Veränderung des genetischen Codes und so zu einem Ausschalten des Gens führen kann [86]. Bei der Verwendung von zwei nahe beieinander liegenden Schnittstellen, kann es sogar zu einer Deletion einer ganzen Region kommen (**Abbildung 3-2**).



**Abbildung 3-2: Lage der generierten gRNA auf dem DHFR Gen in der Region des Exon1.** Blau und mit „gRNA1“ und „gRNA2“ bezeichnet sind die gRNA Sequenzen der CRISPR/Cas9. Kommt es bei beiden gRNA-Sequenzen zu einem Schnitt, so kann es zu einer Deletion der dazwischenliegenden Region kommen.

Die verwendeten Knockoutplasmide, auf denen unter anderem die Erkennungssequenz der Zielregion (gRNA) und das Cas9 Endonuklease Enzym kodiert sind, wurden in Absprache, von der Firma „PolyGene Transgenetics“ entwickelt und kloniert (**Abbildung 3-3**).



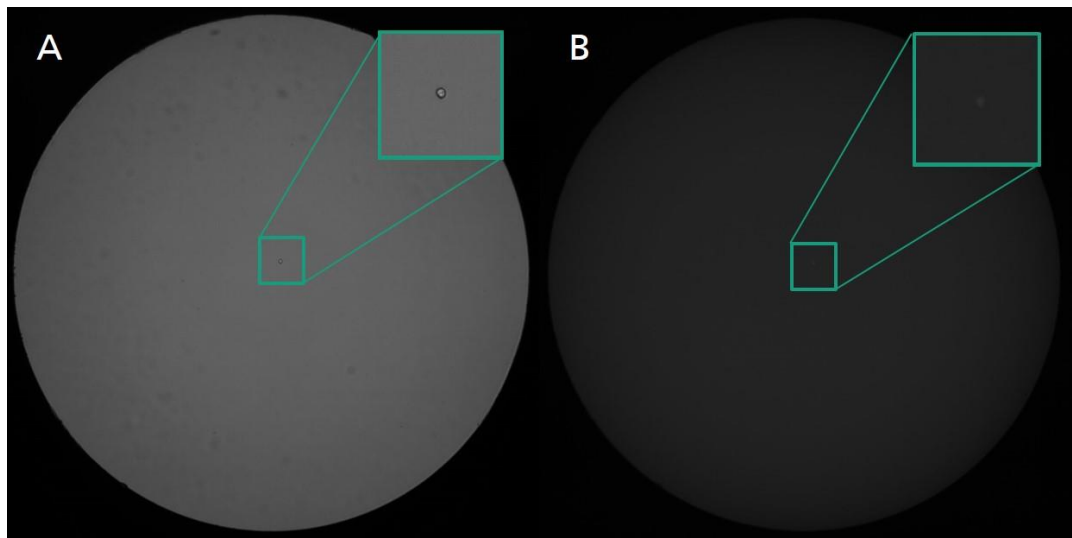
**Abbildung 3-3: CRISPR/Cas9-Plasmid;** Die guide RNA (gRNA) wird über einen RNA Polymerase III Promotor (U6) exprimiert. Als visueller Marker wird grün fluoreszierendes Protein (GFP) über einen Human elongation factor-1 alpha (EF1 $\alpha$ ) Promotor exprimiert. Die Endonuklease (Cas9) wird über einen Cytomegalovirus (CMV) Promotor exprimiert und ist mit einem Kernlokalisierungssignal und zwei Markierungssequenzen verknüpft. Im prokaryotischen Teil des Plasmides ist ein Startpunkt für eine Replikation (pBR322 origin) und eine Ampicillinresistenz kodiert.

Um Sequenzen des DHFR Gens ausfindig zu machen, die sich für einen Knockout eignen, wurde das Gen zunächst auf Basis von Sequenzierdaten von Xu et al., 2011 [87] untersucht. Das DHFR-Gen besteht aus 6 Exons, wobei die wichtigsten Regionen des aktiven Zentrums auf Exon 1 und 2 lokalisiert sind. Diese Aussage wurde auf Basis einer Analyse der DNA-Sequenz mit dem Tool „PROSITE“ [88] getroffen, wobei die Gensequenz des DHFR-Gens auf bekannte Sequenzmotive untersucht wurde. Mit dem Programm „CRISPy“ [89], einem gRNA-Sequenzfinder speziell für CHO-K1 Zellen, das von der Dänischen Technischen Universität öffentlich zur Verfügung gestellt wird, wurden zwei passende gRNA Sequenzen im Exon 1 mit einer potentiell geringen unspezifischen Aktivität herausgestellt. Die markierten Sequenzen sind im Genom der CHO-Zelle nur ein einziges Mal zu finden. Bei Veränderung eines einzelnen Basenpaars sind 44 bzw. 51 Übereinstimmungen im Genom der Zelle vorhanden (**Abbildung 3-4**). Diese Ähnlichkeit kann zu Aktivitäten des Cas9-Enzyms an unspezifischen Stellen des Genoms der Zelle führen. Diese *off-target* Effekte können durch Sequenzierung der entsprechenden Stellen des Genoms (*deep sequencing*) festgestellt werden [90, 91]. Detektiert werden hier jedoch nur Mutationen, die durch eine Insertion oder Deletion von Basenpaaren, also durch NHEJ, entstanden sind [56].



nicht mehr in der Lage sind, diese lebensnotwendigen Bausteine der DNA zu synthetisieren [92].

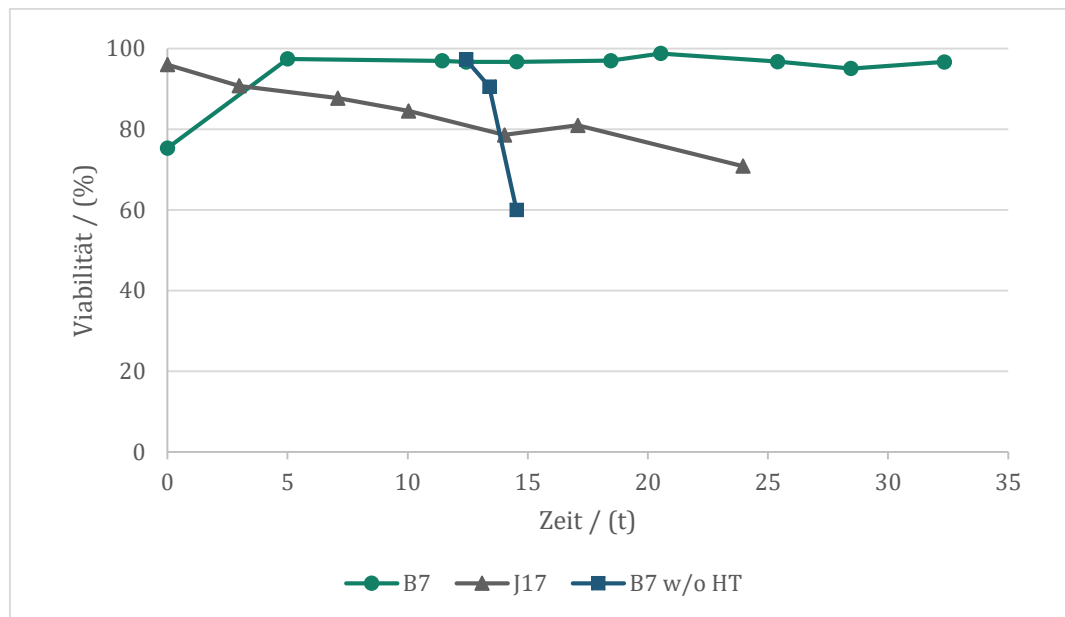
Die Einzelzellklonierung wurde mit dem automatisierten Mikroskop „NyOne“ der Firma SynGene dokumentiert und verfolgt. Es wurde ein Aufnahmemodus ausgewählt, der sowohl eine Aufnahme im Hellfeld, als auch eine fluoreszenzangeregte Aufnahme generiert. Zellen, die am Tag der Aussaat (Tag 0) eine grüne Fluoreszenz aufwiesen, konnten somit als potentielle Knockoutzellen identifiziert werden, da sie das Knockout-Plasmid enthielten. Gleichzeitig konnte die Klonalität der einzelnen Zellen durch zusätzliche Aufnahmen an Tag 1 bestimmt werden.



**Abbildung 3-5: Aufnahmen des Wells B7** der Platte 3 der Einzelzellklonierung unmittelbar nach der Transfektion (Tag0). (A) Aufnahme im Hellfeld. (B) Aufnahme mit Detektion der Fluoreszenz.

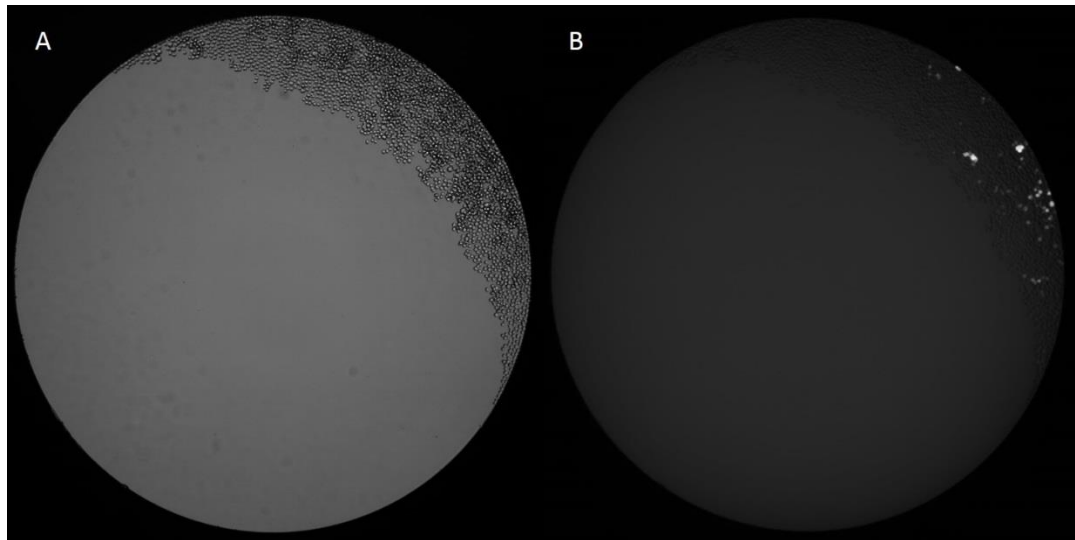
An Tag 10 wurden ausgehend von vier 384 Wellplatten insgesamt 40 Klone, die an Tag 0 ein positives GFP Signal aufwiesen, ausgewählt und auf 96 Wellplatten expandiert. Beim nächsten Expansionsschritt auf 24 Wellplatten wurden bereits 22 Klone auf Grund von schlechtem Wachstum verworfen. Bis hin zu einer Kultivierung in 125 mL Schüttelkolben haben sich lediglich zwei Klone mit den Bezeichnungen B7 und J17 durchgesetzt, wobei die Viabilität des Klons J17 im Laufe der Kultivierung stetig abnahm (**Abbildung 3-6**). Nach einer Kultivierung über 24 Tage wurde der Klon J17 verworfen. Bei dem Klon B7 wurde nach 12 Tagen neben der Kultivierung mit dem HT-Zusatz ein Ansatz ohne den für die Knockout-Zellen lebenswichtigen Zusatz kultiviert. Das

schnelle Abfallen der Viabilität dieser Kultivierung ließ bereits die Vermutung auf ein erfolgreiches Ausschalten des DHFR-Gens zu.



**Abbildung 3-6: Verlauf der Viabilität der Klone B7 und J17** bei einer Kultivierung in 125 mL Schüttelkolben. Die Viabilität des Klons J17 nahm während der Kultivierung kontinuierlich ab (grau), wobei die Viabilität des Klons B7 stabil über 95% blieb (grün). Bei Abwesenheit des HT-Supplements nahm die Viabilität schnell ab (blau).

Bei dem verbleibenden Klon B7 wurde bereits ab der ersten Passage eine stabile Viabilität von über 95% festgestellt. Die Wachstumsrate kann in diesem Fall nicht als Charakteristik für die Zelllinie herangezogen werden, da CHO Zellen bei einem ausgeschalteten DHFR-Gen trotz Zugabe des HT-Zusatzes eine geringere Wachstumsrate ausweisen als wildtyp CHO Zellen [93]. Es wurde festgestellt, dass einige Zellen des Klones B7 das Knockoutplasmid in Ihr Genom integriert haben. Diese Zellen sind daran zu erkennen, dass sie, wie in **Abbildung 3-7** zu sehen ist, auch zehn Tage nach der Transfektion ein grünes Fluoreszenzsignal aufweisen. Die Integration muss nach dem Ausschalten des DHFR-Gen geschehen sein, da bei einer späteren Sequenzierung genau zwei unterschiedliche Sequenzen für das DHFR-Gen gefunden wurden (**Abbildung 3-8**), die je für ein Allel stehen. Die durch die Integration nicht vorhandene Klonalität der Zellen ist zu diesem Zeitpunkt kein Ausschlusskriterium, da bei einer späteren Zelllinienentwicklung erneut eine Einzelzellklonierung vorgenommen werden muss.



**Abbildung 3-7: Aufnahmen des Wells B7 zehn Tage nach der Transfektion (Tag10).** (A) Aufnahme im Hellfeld. (B) Aufnahme mit Detektion der Fluoreszenz.

Bei einer transienten Transfektion liegt das Plasmid in der Regel nur 24 bis 72 Stunden in der Zelle vor, da es nicht in das Zellgenom integriert wird und somit durch Zellteilung und andere Faktoren verloren geht [94]. Eine Aufnahme des Knockoutplasmids in das Zellgenom wird durch den hervorgerufenen Doppelstrangbruch, der durch das Cas9 Enzym hervorgerufen wird, begünstigt [57]. Da der Anteil an Zellen, die das Plasmid integriert haben sehr gering war, wurden diese durch die Passagieroutine aus der Kultur ausverdünnt. Dies wurde durch eine wiederholte Untersuchung der Zellen im Durchflusszytometer auf GFP positive Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Alternativ hätte eine weitere Einzelzellklonierung durchgeführt werden können.

Um den Knockout eindeutig zu beweisen, wurde eine Sequenzierung der genomischen DNA im Bereich des DHFR Gens vorgenommen. Hierfür wurde die genomische DNA der Zellen isoliert und eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) für die Amplifikation des Exon1 des DHFR-Gens vorgenommen. Die PCR-Produkte wurden dann mittels TA-Klonierung in ein Plasmid eingefügt und dann für eine Amplifikation in kompetente E.coli Bakterien transformiert. Bei der Sequenzierung von 10 Klonen ergaben sich wie zu erwarten zwei unterschiedliche Sequenzen (zwei Allele), die beide von der ursprünglichen DNA-Sequenz des DHFR Gens abwichen.





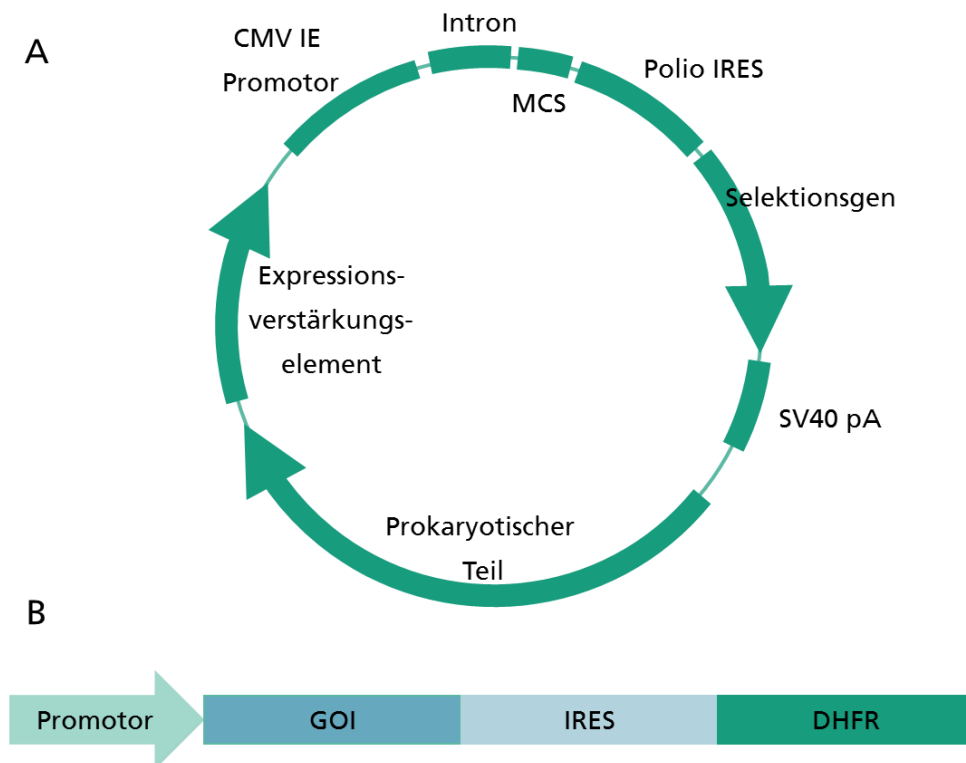
**Abbildung 3-8: Ergebnisse der Sequenzierung im Vergleich zur genomischen DHFR-Sequenz.** Die Sequenzierung ergab zwei unterschiedliche Sequenzen, die dadurch zustande kommen, dass das Gen auf zwei Allelen kodiert ist. Die Sequenzen, die unter (A) zusammengefasst sind, weisen ein zusätzliches Basenpaar am Ende des Exon1 auf, wodurch es zu einer Leserasterverschiebung im weiteren Gen kommt. Die Sequenzen, die unter (B) zusammengefasst sind weisen am Ende des Exon1 mehrere Mutationen und ebenfalls ein zusätzliches Basenpaar auf.

In **Abbildung 3-8** ist zu erkennen, dass sich bei beiden Allelen durch eine Insertion eines zusätzlichen Basenpaars am Ende des Exon1 eine Leserasterverschiebung ergeben hat. Bei Allel **B** sind neben dem zusätzlichen Basenpaar Basen ausgetauscht worden. Zusätzlich ist es außerhalb des Exon 1 zu weiteren Deletionen bzw. Austauschen von Basenpaaren gekommen, wodurch in beiden Fällen die 5'-Spleißerkennungssequenz (AG-GU) [95] verloren gegangen ist. Dies führt zu einem fehlerhaften Spleißprozess, sodass das aus diesem Gen resultierende DHFR-Enzym nicht mehr funktionsfähig ist. Die aus diesen Versuchen generierte Zelllinie wird im Folgenden als HITB7 CHO bezeichnet und ist Grundlage der Produktionsplattform.



### 3.2.4. Zelllinienentwicklung mit grün fluoreszierendem Protein (GFP)

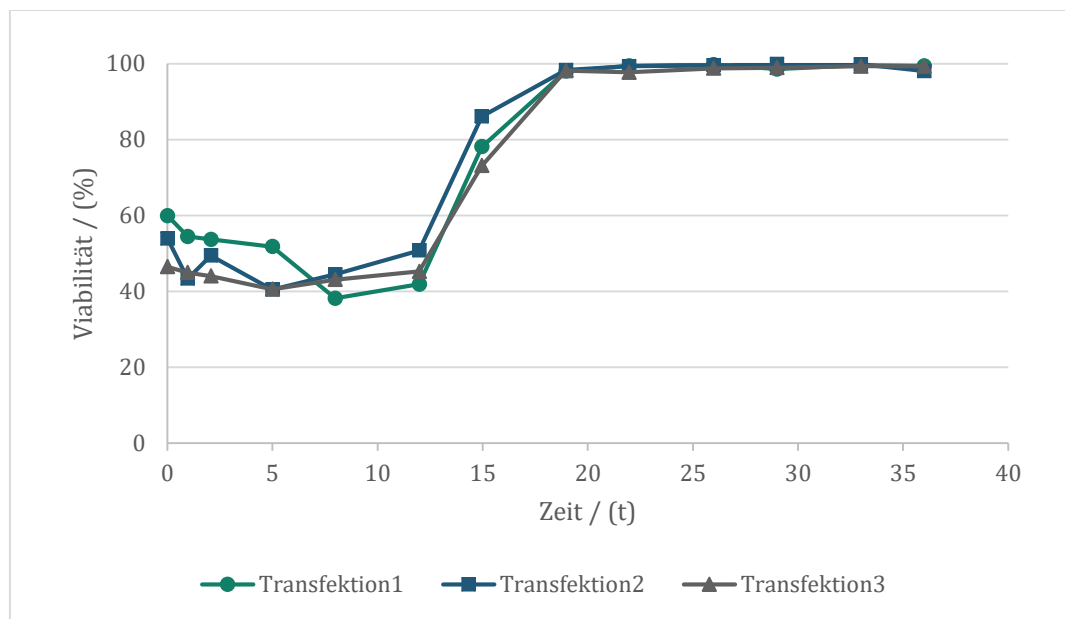
Ein erster Test, um die Funktionalität der Expressionsplattform auf Basis des DHFR Selektionsgens zu prüfen, wurde mit dem „Produkt“ GFP durchgeführt. Der große Vorteil bei einer Expression von GFP ist, dass das Produkt visuell detektiert und über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) eine relative Produktivität bestimmt werden kann. So kann neben der Überprüfung des Selektionssystems auch die Funktion der Amplifikation mit Hilfe der MFI getestet werden.



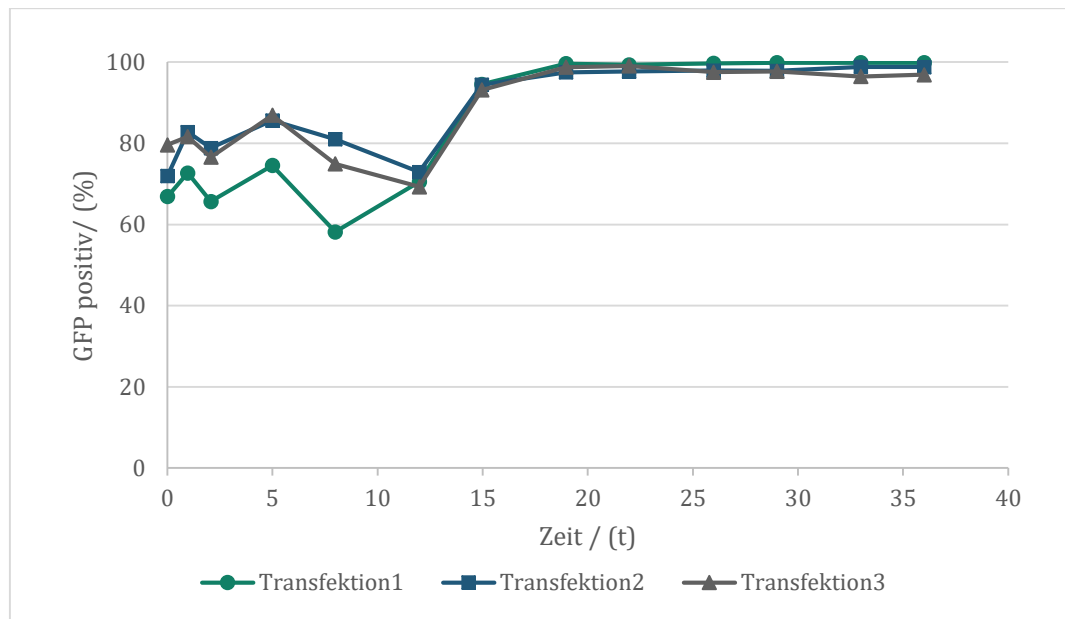
**Abbildung 3-9: Karte des GFP exprimierenden Plasmids und der Expressionskassette.** (A) Das gene of interest (GOI), in diesem Fall GFP, wird in die multiple cloning site (MCS) eingefügt. (B) Der Promotor exprimiert das grün fluoreszierende Protein, welches über eine interne ribosomale Eintrittsstelle mit dem Selektionsgen Dihydrofolatreduktase (DHFR) verbunden ist.

Das Expressionsplasmid (**Abbildung 3-9**) exprimiert das GFP über einen Promotor des Cytomegalovirus (CMV). Das GFP ist über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit dem DHFR-Gen verbunden. Die Transfektion wurde mittels Elektroporation in drei Ansätzen (TF 1-3) durchgeführt. Vor der Transfektion wurden die Zellen in Hypoxanthin und Thymidin (HT) haltigem Medium kultiviert, um das fehlende DHFR-Gen zu kompensieren. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in HT freies Medium umgesetzt, wodurch die Selektion eingeleitet wurde. In regelmäßigen

Abständen wurde die Konzentration der viablen Zellen, die Viabilität und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt. In **Abbildung 3-12** ist der Verlauf der MFI über die Zeit dargestellt. Nach der Transfektion nahm die MFI zunächst ab. In dieser Phase der Selektion geschieht die Expression noch transient und ist dementsprechend hoch. Es befinden sich viele Expressionsplasmide in der Zelle, wobei nur wenige von ihnen in das Genom der CHO-Zelle aufgenommen werden und somit verloren gehen. Zwischen fünf und acht Tagen nach der Transfektion erreichte die Konzentration der viablen Zellen ihren Tiefpunkt (ca. 40% Viabilität). An Tag 19 nach der Transfektion war die Selektion abgeschlossen, was an einer Viabilität von mehr als 98% zu erkennen ist. Zu diesem Zeitpunkt waren mehr als 98% der Zellen GFP positiv (**Abbildung 3-11**).



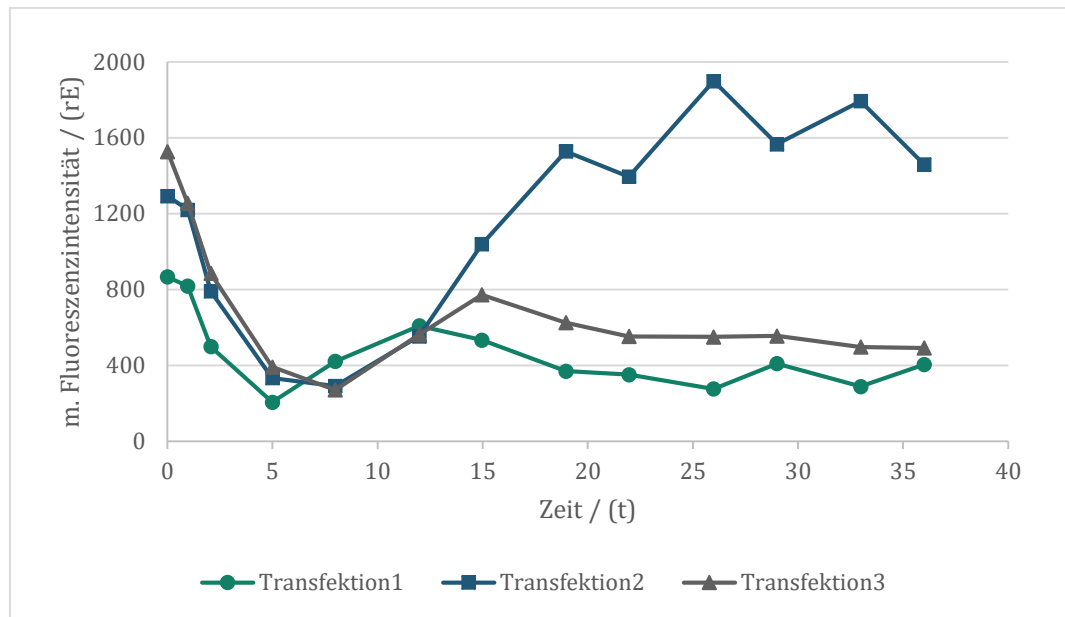
**Abbildung 3-10: Verlauf der Viabilität bei der Selektion ohne HT.** Die Viabilität der CHO-Zellen liegt nach der Transfektion bereits zwischen 40 und 60%. Dieses Phänomen kann bei der Elektroporation auftreten, da die Zellen einem großen Stress ausgesetzt werden. Durch den Selektionsdruck nach 48 Stunden sinkt die Viabilität zunächst leicht, steigt dann aber wieder an, sodass nach 20 Tagen bei allen Ansätzen eine Viabilität von über 98% erreicht wird.



**Abbildung 3-11: Prozentualer Anteil an GFP positiven Zellen.** Durch die hohe Transfektionseffizienz sind direkt nach der Transfektion bereits 70-80% der Zellen GFP positiv. Durch die Selektion wird bei allen Ansätzen ein Anteil von mehr als 98% erreicht und bleibt über mehrere Tage stabil erhalten.

Die Transfektionsansätze eins und drei weisen eine ähnliche MFI im Bereich zwischen 250 und 500 relativen Einheiten (rE) auf. Ansatz zwei liegt bei der MFI mit Werten zwischen 1600 und 1900 rE wesentlich höher (**Abbildung 3-12**). Die Expression ist dabei von der Anzahl und der Position der Plasmide, die in das Zellgenom aufgenommen wurden abhängig.

Bei diesem Versuch wird deutlich, dass die Anzahl der Transfektionsansätze wichtig ist, um einen möglichst guten Produktionszellklon zu erhalten, da die Produktivität (MFI) von Ansatz zu Ansatz stark variieren. Wenn die Produktivität im Poolstadium, also bei einer Kultur bestehend aus mehreren Zellklonen bereits hoch ist, so ist die Wahrscheinlichkeit bei einer Einzelzellklonierung einen sehr gut produzierenden Zellklon zu finden entsprechend höher.



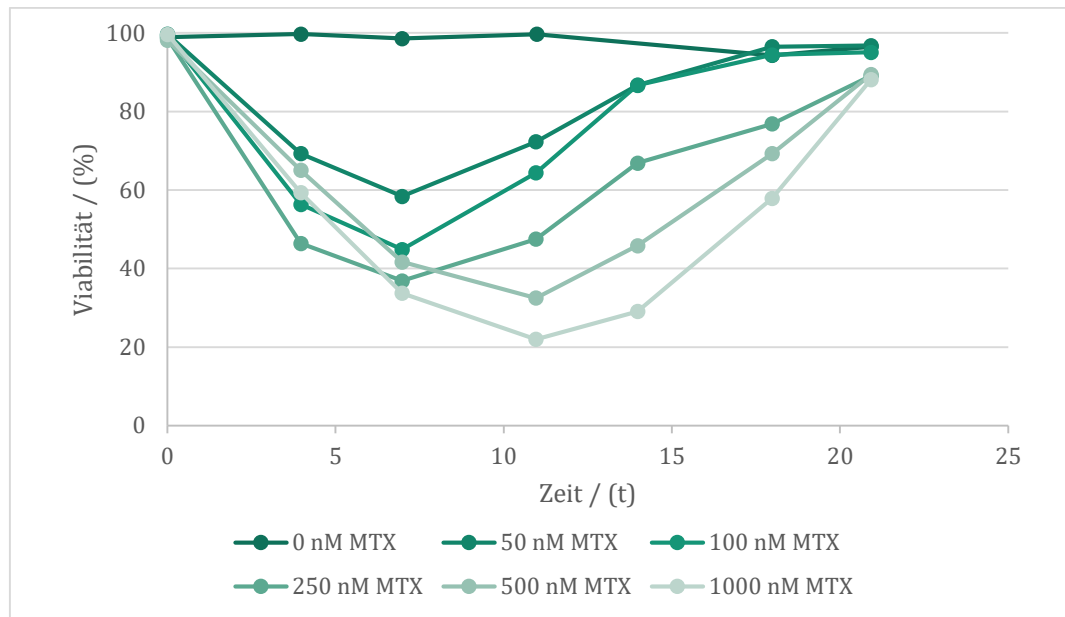
**Abbildung 3-12: Mittlere Fluoreszenzintensität der GFP exprimierenden HITB7 Zellen.** Die MFI ist in einer relativen Einheit (rE) angegeben. Die erste Messung wurde 48 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Nach 19 Tagen war die Selektion abgeschlossen, was an einer Viabilität der Zellen von mehr als 98% ablesbar ist (Daten nicht gezeigt). Im weiteren Verlauf wurde gezeigt, dass die Expression stabil ist.

Nachdem in diesem Versuch bewiesen wurde, dass die Selektion der CHO Zellen durch Weglassen des HT-Zusatzes in einer Ausbeute von 99% produzierenden Zellen resultiert, wurde ein Amplifikationsversuch durchgeführt.

### 3.2.5. Amplifikationstest des GFP-Gens

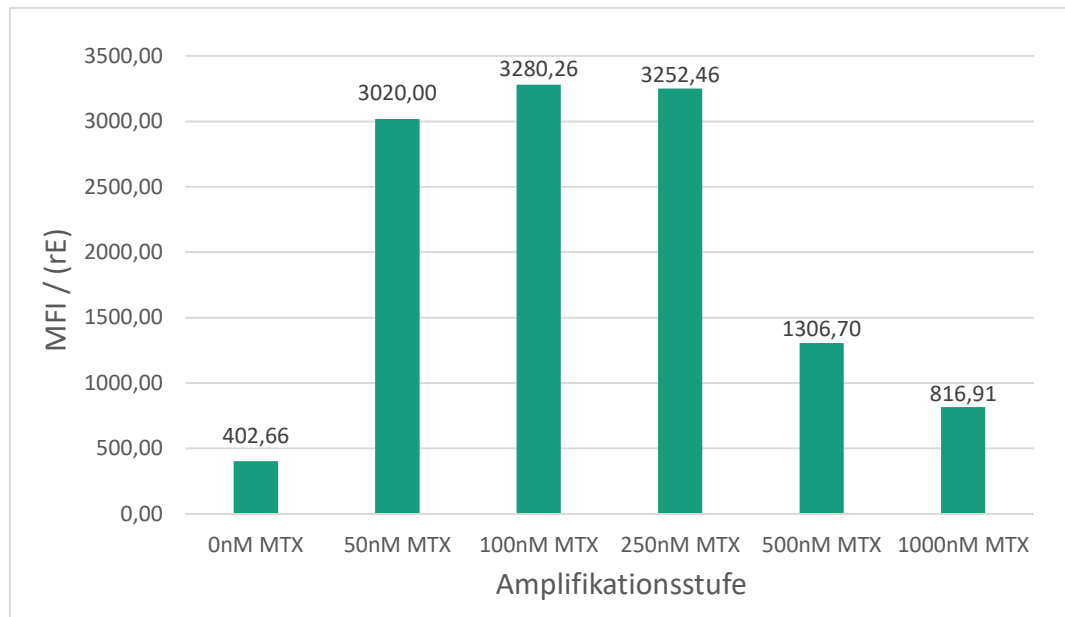
Als Ausgangspunkt für die Amplifikation wurde der Transfektionsansatz 1 gewählt, da die MFI-Werte des zweiten Ansatzes bereits nah am oberen Maximum des Messbereiches des Durchflusszytometers (ca. 3000 rE) lagen. Um herauszustellen welche MTX Konzentration die beste Startkonzentration ist, wurden Amplifikationen mit 0nM, 50nM, 100nM, 250nM, 500nM und 1000nM MTX durchgeführt.

In **Abbildung 3-13** ist zu sehen, dass mit steigender MTX Konzentration die Viabilität tiefer fällt, wobei nach 21 Tagen alle Amplifikationsansätze wieder eine Viabilität von über 90% aufweisen. An diesem Punkt wurde die MFI der einzelnen Ansätze bestimmt und bewertet.



**Abbildung 3-13: Verlauf der Viabilität bei Amplifikation** mit unterschiedlichen MTX Konzentrationen. Je höher die MTX Konzentration, desto mehr knickt die Viabilität der Zellen ein. Nach 21 Tage ist die Viabilität der Zellen wieder über 90%.

Die MFI des ersten Amplifikationsansatzes mit 50nM MTX weist bereits eine MFI außerhalb des Messbereiches des Durchflusszytometers auf. Auch die Messwerte der Ansätze mit 100nM und 250nM MTX liegen außerhalb des maximalen Messbereiches, wohingegen die Amplifikationen mit 500nM und 1000nM MTX eine geringere MFI aufweisen. Diese Ergebnisse decken sich mit der Literatur, die ein Phänomen beschreibt, bei dem die Amplifikation mit einer zu hohen Startkonzentration von MTX zu einer schlechteren Expression des GOI führt [96, 97]. Grund hierfür sind Resistenzen gegen das MTX, die nicht auf einer Amplifikation des DHFR-Gens basieren, sondern, wie bereits unter **3.2.1** beschrieben, auf einer Membranmutation oder einer Mutation der Dihydrofolatreduktase.



**Abbildung 3-14: Amplifikation des GFP-Gens durch MTX Zugabe.** Die Zugabe von MTX zu den GFP exprimierenden Zellen in verschiedenen Konzentrationen führte bei den Konzentrationen 50nM, 100nM und 250nM MTX zu einer Zunahme der MFI bis überhalb des Messbereiches des Durchflusszytometers. Bei den Konzentrationen 500nM und 1000nM MTX war die MFI im Vergleich geringer.

Um eine optimale Steigerung der Produktivität zu erhalten, wird daher in folgenden Versuchen eine stufenweise Erhöhung der MTX Konzentration im Zellkulturmedium vorgenommen. Nach jedem Schritt sollen sich die Zellen wieder auf eine Viabilität von über 90% erholen, bevor der nächste Schritt vorgenommen wird. So soll gewährleistet werden, dass die Amplifikation möglichst effizient abläuft.

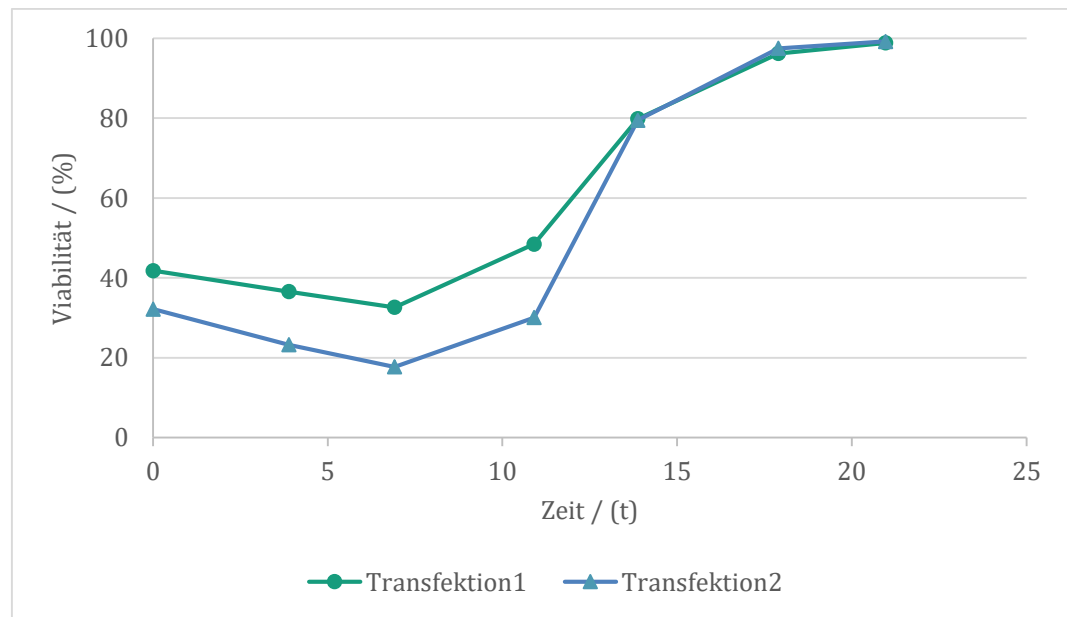
### 3.3. Zelllinienentwicklung mit DHFR-MTX-System

Für die Testung der entstandenen Produktionsplattform wurden zwei Modellmoleküle ausgewählt, die bereits mit anderen Produktionsplattformen hergestellt wurden. Zum einen ein vollständiger Antikörper, da diese Klasse der Moleküle eine der größten Gruppen der therapeutischen Proteine darstellt [1] und zum anderen ein *single chain Fragment variable* (scFv), ein Molekül, das nur aus dem variablen Teil eines Antikörpers besteht. Dieses Molekül wurde ausgewählt, da es auf Grund seiner geringen Größe von nur 25 kD schwierig in großen Mengen herzustellen ist. Außerdem ist ein großer Vorteil bei der Produktion dieses Moleküls, dass das Protein aus einer zusammenhängenden Aminosäurekette besteht und somit von einem Plasmid exprimiert werden kann.

#### 3.3.1. Zelllinienentwicklung scFv

Die erste Zelllinie, die mit der neuen Produktionsplattform entwickelt wurde, war eine scFv exprimierende Zelllinie. Die Besonderheit bei diesem scFv-Fragment ist, dass eine Glykosylierung vorliegt und somit eine Expression in einer eukaryotischen Plattform notwendig ist. Für die Entwicklung wurde das GOI in das Expressionsplasmid eingefügt und dieses in zwei Ansätzen mittels Elektroporation in die HITB7 CHO Zelllinie transfiziert. Parallel wurden Transfektionen mit einem GFP exprimierenden Plasmid durchgeführt, um die Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie abschätzen zu können (Kontrollansätze). Zwei Tage nach der Transfektion wurde die Viabilität der einzelnen Transfektionen bestimmt und die Kontrollansätze zusätzlich auf eine grüne Fluoreszenz untersucht. Die Transfektion mittels Elektroporation führte zu einer geringen Viabilität von 30-40 %. Die Transfektionseffizienz (Anteil GFP positiver Zellen an der Gesamtzellzahl) lag bei über 90 % und die MFI war im Vergleich zu anderen Transfektionsmethoden viel stärker, was auf eine höhere Anzahl an Plasmiden in den Zellen und somit auf eine höhere Wahrscheinlichkeit schließen lässt, dass die Plasmid-DNA in das Zellgenom aufgenommen wird. Außerdem steigt durch den Stress, der durch die Elektroporation auf die Zellen ausgeübt wird, die Häufigkeit von Doppelstrangbrüchen, die einer Integration vorangehen müssen.

Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturmedium ohne HT-Zusatz kultiviert und somit die Selektionsphase begonnen.

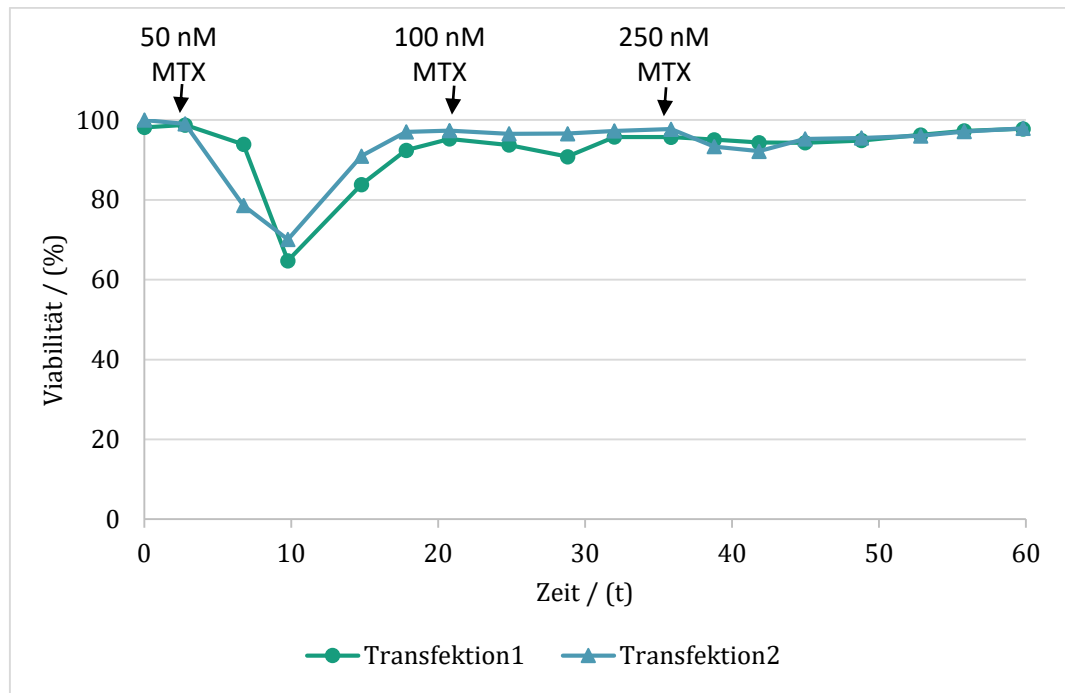


**Abbildung 3-15: Verlauf der Viabilität während der Selektion.** Die niedrige Startviabilität ist der Transfektionsmethode geschuldet. Diese führt zu einer niedrigen Viabilität, zeitgleich aber auch zu einer hohen Transfektionseffizienz. 48 Stunden nach der Transfektion mit dem Expressionsplamid wurde die Selektion durch Entfernen des HT-Zusatzes im Zellkulturmedium eingeleitet. Die Viabilität steigt innerhalb von 21 Tagen auf einen Wert von über 99%.

21 Tage nach der Transfektion war die Selektion abgeschlossen, was durch eine Viabilität von über 99 % und der charakteristischen Wachstumsrate von ca.  $0,03 \text{ h}^{-1}$  (Daten nicht abgebildet) der Zellen zu erkennen war. Weitere Merkmale, an denen erkannt werden kann, ob die Zellen Stress ausgesetzt sind und die Selektion bzw. die Amplifikation noch nicht abgeschlossen ist, sind der Zelldurchmesser und die Aggregationsrate. Beide Werte steigen während der Selektion bzw. Amplifikation des DHFR-Gens an, normalisieren sich jedoch, wenn die Zellen auf den entstehenden Druck reagiert haben. Der durchschnittliche Zelldurchmesser einer CHO Zelle liegt bei 12-14  $\mu\text{m}$  [98]. Während der Selektion und dem ersten Amplifikationsschritt stieg der durchschnittliche Zelldurchmesser auf über 16  $\mu\text{m}$  an.

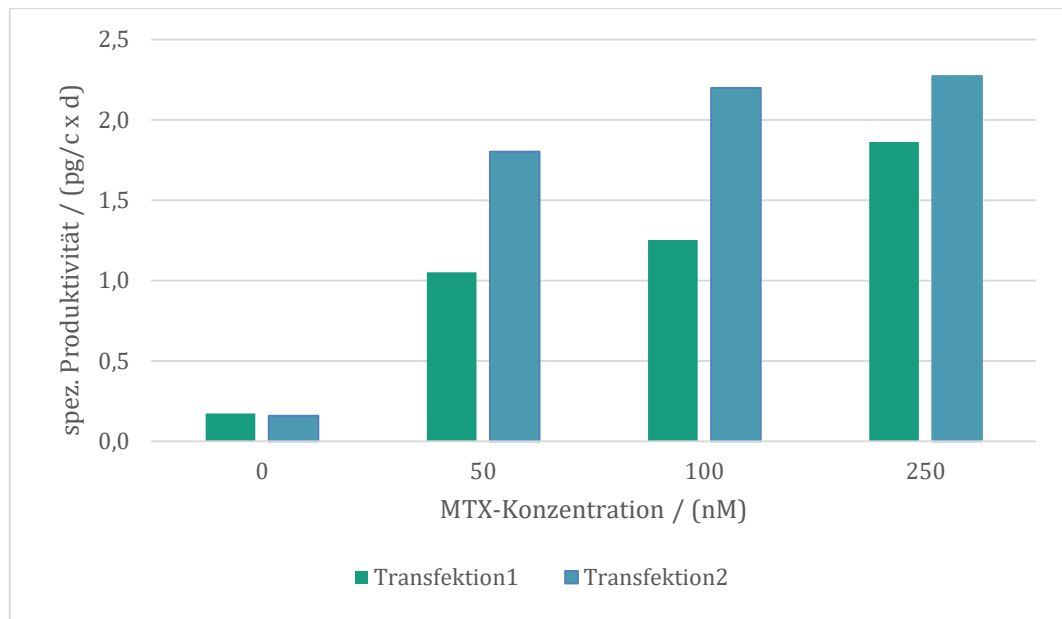
Die Amplifikation mit MTX wurde in den Stufen 50 nM, 100 nM, und 250 nM vorgenommen. Der nächste Amplifikationsschritt wurde jeweils bei Überschreiten von 95 % Viabilität der Kultur gestartet.





**Abbildung 3-16: Verlauf der Viabilität während der Amplifikation.** An Tag 3 der Amplifikation wurde in dem Zellkulturmedium eine MTX Konzentration von 50 nM eingestellt. Nach einem Abfall und einer Erholungsphase der Viabilität wurde die MTX Konzentration am Tag 21 auf 100 nM erhöht. Der Einbruch der Viabilität fiel bei diesem Schritt nicht so groß aus, sodass an Tag 35 die Konzentration von MTX auf 250 nM angehoben werden konnte. 60 Tage nach Start der Amplifikation wurde eine Viabilität von über 97% erreicht.

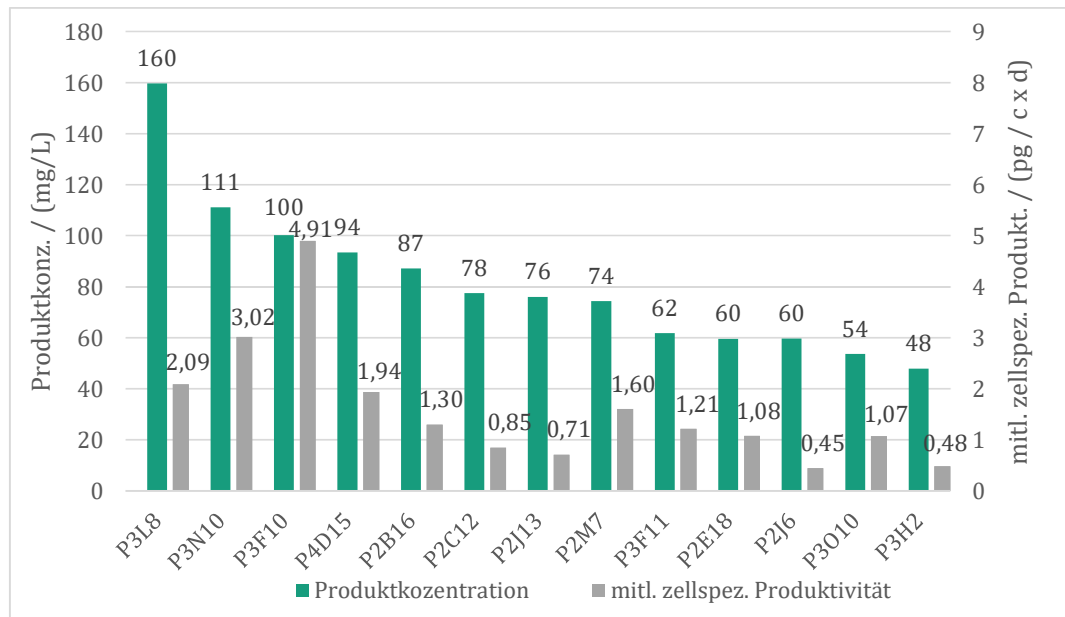
Mit allen Amplifikationsstufen wurde ein standardisierter Fed-Batch durchgeführt, um die Veränderung der zellspezifischen Produktivität zu ermitteln. Die mittlere zellspezifische Produktivität (MPCD) der HITscFv CHO Zellen wurde mit den Formel aus 5.2.2.13 berechnet. Hierfür wurde die entstandene Produktmasse durch das Integral der viablen Gesamtzellzahl (IVCN) geteilt. Bei allen Amplifikationsstufen wurde eine Steigerung der MPCD erreicht. Die beiden Zellpools, die durch die Selektion, also ohne Amplifikation, entstanden sind, weisen eine ähnliche MPCD zwischen 0,16 und 0,17 pg/c×d auf. Bei der Fed-Batchkultivierung führte dies zu einer Produktkonzentration von ca. 6,5 mg/L. Durch die Amplifikation mit 50 nM MTX konnte die MPCD des ersten Transfektionsansatzes (HITB7scFv.1) auf über 1 pg/c×d gesteigert werden. Bei dem zweiten Transfektionsansatzes (HITB7scFv.2) konnte die MPCD sogar auf 1,8 gp/c×d erhöht werden (**Abbildung 3-17**). Die Amplifikation läuft dem entsprechend unterschiedlich gut ab. Dies kann durch den Integrationsort beeinflusst sein, da die Amplifikation, zumindest in der frühen Phase, in demselben Chromosomenarm stattfindet, in dem auch das Plasmid integriert wurde [99].



**Abbildung 3-17: Steigerung der Produktivität durch MTX Zugabe.** Die mittlere zellspezifische Produktivität steigt bei jeder Steigerung der MTX Konzentration im Zellkulturmedium. Die Daten wurden in Fed-Batch Prozessen generiert.

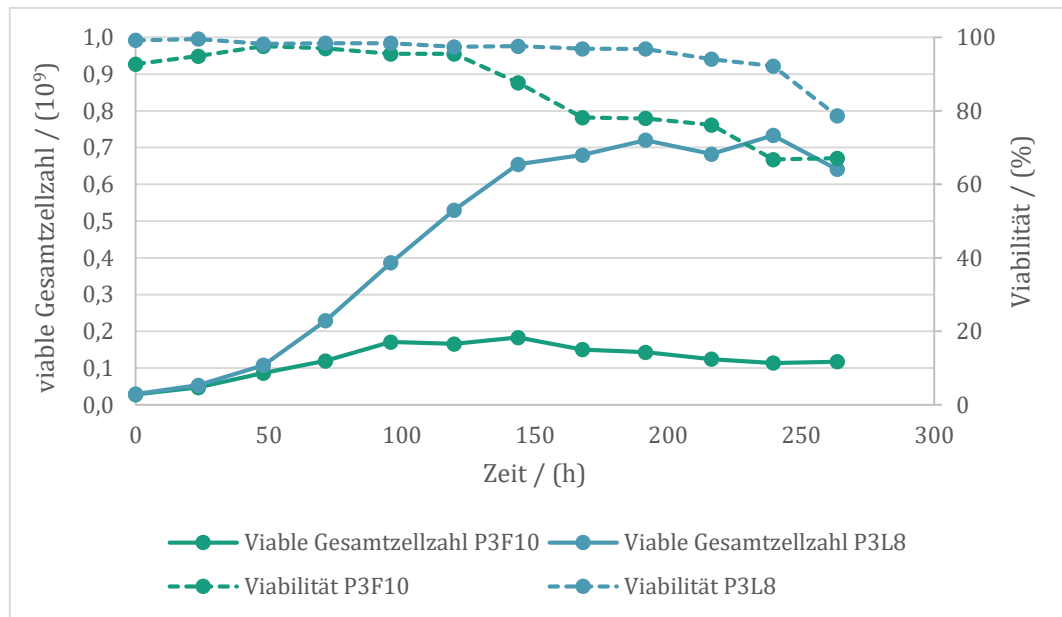
Durch die stufenweise Amplifikation des GOI mittels MTX mit einer maximalen Konzentration von 250 nM MTX im Zellkulturmedium konnte die MPCD im ersten Ansatz um den Faktor 10,7 und im zweiten Ansatz sogar um den Faktor 14,3 erhöht werden. Zu erkennen ist, dass die Amplifikation in den beiden Ansätzen unterschiedlich gut verläuft. Die maximale Produktkonzentration im besseren Ansatz (Ansatz 2 mit 250 nM MTX) betrug 127 mg/L nach dem standardisierten Fed-Batch. Dieser Ansatz wurde ausgewählt, um eine Einzelzellklonierung durchzuführen.

Mit den Einzelzellklonen wurde für die Vergleichbarkeit ebenfalls ein standardisierter Fed-Batchprozess gefahren und aus den Ergebnissen der mittleren zellspezifischen Produktivität und der Produktkonzentration am Ende des jeweiligen Prozesses eine Rangliste erstellt.



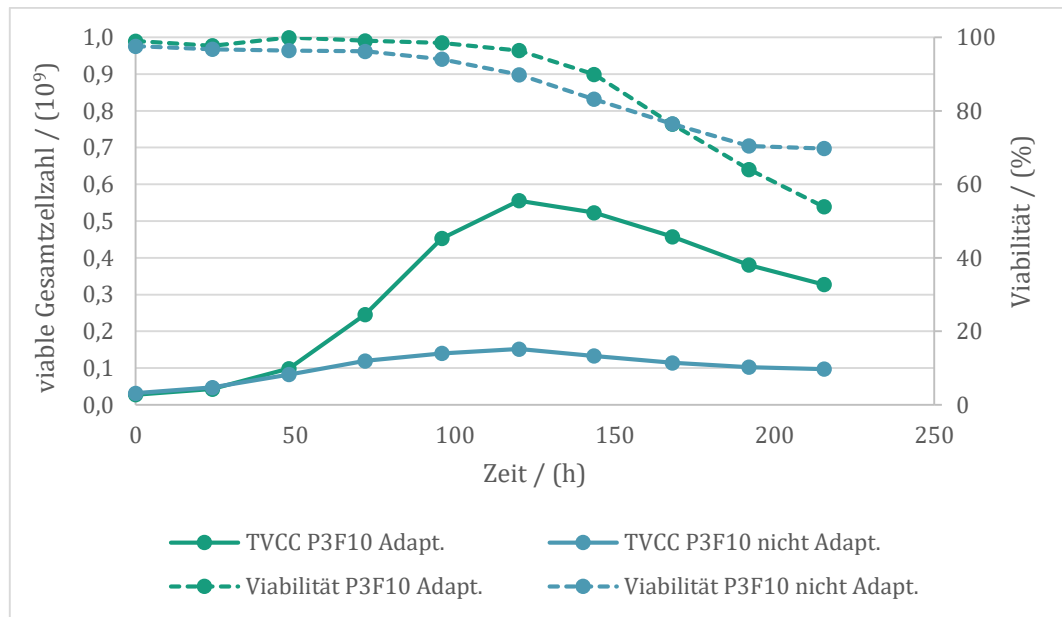
**Abbildung 3-18 Produktkonzentration und mitl. zellspez. Produktivität der scFv exprimierenden Zellklone im Fed-Batchprozess.**

Der Klon P3L8 weist am Ende der Kultivierung mit 160 mg/L die höchste Produktkonzentration auf. Die mittlere zellspezifische Produktivität liegt bei 2,09 pg/c×d. Der Zellklon P3F10 führt zu einer Produktkonzentration von 100 mg/L, hat mit 4,91 pg/c×d aber mit Abstand die höchste mittlere zellspezifische Produktivität. Betrachtet man die Gesamtzahl der viablen Zellen (**Abbildung 3-19**), fällt auf, dass der Klon P3F10 ein wesentlich schlechteres Wachstum ausweist, als der Klon P3L8. Hintergrund ist, dass die Vorkultur der Zellklone im Klonierungsmedium ProCHO™5 stattfindet und die Zellen für den Fed-Batch direkt in das Produktionsmedium ExCell®CHO Advanced™ überführt werden. Diese Praxis hat sich für die HIT Zelllinien als sehr solide herausgestellt. Gelegentlich müssen jedoch Zellklone zunächst an das Produktionsmedium adaptiert werden. Diese Klone weisen ohne Adaption ein schlechtes Wachstum im Produktionsmedium auf.



**Abbildung 3-19: Verlauf der viablen Gesamtzellzahl und der Viabilität der zwei betrachteten Klone.** Der Klon P3L8 weist mit über  $0,7 \times 10^9$  Zellen eine wesentlich höhere maximale Gesamtzellzahl auf als der Klon P3F10 mit weniger als  $0,2 \times 10^9$  Zellen. Die Viabilität des Klons P3F10 fängt bereits nach 120 Stunden merklich an zu sinken, während die Viabilität des Klons P3L8 erst nach 180 Stunden sinkt.

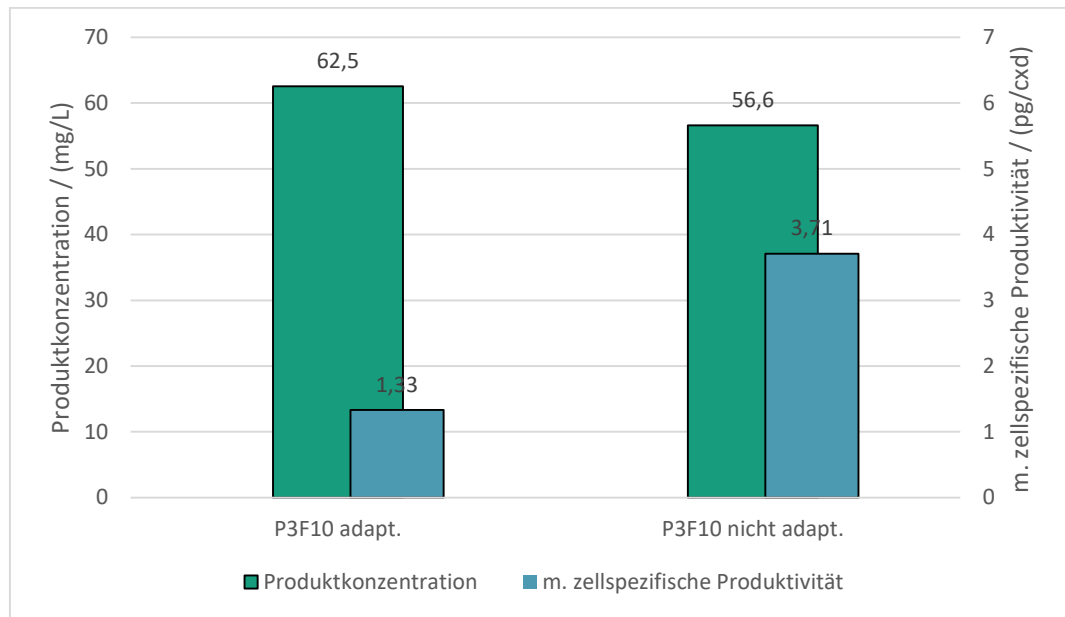
Mit dem Zellklon P3F10 wurde dementsprechend eine Adaption durchgeführt, die zu einer Wachstumsrate von  $0,027 \text{ h}^{-1}$  führte. Anschließend wurde erneut ein Fed-Batch in Doppelbestimmung durchgeführt. Zum einen mit dem adaptierten Klon, zum anderen, als Vergleich, mit dem nicht adaptierten Klon. Bei gleichbleibender MPCD und einem Wachstum ähnlich dem Klon P3L8, würde so rechnerisch eine Produktkonzentration von  $372 \text{ mg/L}$  erreicht werden.



**Abbildung 3-20: Verlauf der viablen Gesamtzellzahl und der Viabilität der adaptierten Zellen im Vergleich zu den nicht adaptierten Zellen.** Das Wachstum der Zellen konnte durch die Adaption wesentlich verbessert werden. Die Viabilität der nicht adaptierten Zellen nimmt zunächst schneller ab, als die der adaptierten Zellen. Gegen Ende der Kultivierung sinkt die Viabilität der adaptierten Zellen jedoch wieder unter die der nicht Adaptierten. TVCC = total viable cell count (viable Gesamtzellzahl)

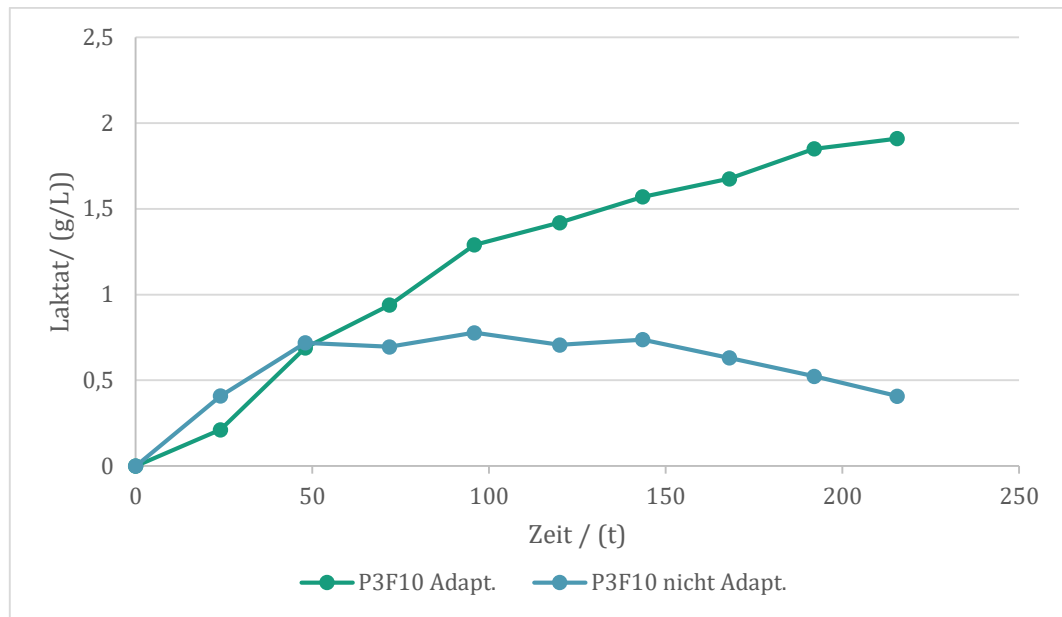
In **Abbildung 3-20** ist das Wachstum der adaptierten und nicht adaptierten Zellklone während des Fed-Batch-Prozesses in einem Graphen dargestellt. Durch die Adaption konnte das Wachstum wesentlich verbessert werden, der Prozess musste jedoch aufgrund einer schnell abnehmenden Viabilität nach 215 Stunden (9 Tagen) abgebrochen werden.

Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurde der Vergleichsprozess ebenfalls abgebrochen. Die um 48 Stunden verkürzte Prozesszeit muss bei einem Vergleich mit dem vorherigen Fed-Batchprozess berücksichtigt werden. Die Produktkonzentration bei dem adaptierten Klon liegt im Mittel bei 62,5 mg/L und bei dem nicht adaptierten Klon bei 56,6 mg/L. Durch das gute Wachstum des adaptierten Klons ist die mittlere zellspezifische Produktivität hier mit 1,3 pg/c×d wesentlich geringer, als bei dem nicht adaptierten mit 3,7 pg/c×d.



**Abbildung 3-21: Produktivität des adaptierten Klons P3F10.** Die Produktkonzentration am Ende des Prozesses ist bei beiden Prozessen sehr ähnlich und liegt zwischen 56,6 und 62,5 mg/L. Die mittlere zellspezifische Produktivität ist jedoch, aufgrund des schlechten Wachstums der nicht adaptierten Zellen, bei den nicht adaptierten Zellen wesentlich höher.

Die Adaption hat somit zu einem besseren Wachstum, jedoch gleichzeitig zu einer Abnahme der zellspezifischen Produktivität geführt. Außerdem fällt die Viabilität der Zellen nach 10 Tagen bereits unter 60%. Die Apoptose wird demnach bei den adaptierten Zellen schneller eingeleitet. Die Annahme, dass die Zellen bei Verbesserung des Wachstums ihre zellspezifische Produktivität behalten wurde somit nicht bestätigt. Dies könnte auf das instabile Genom der CHO Zelle [87] und einer Umstellung des Metabolismus während der Adaption an das Produktionsmedium zurückgeführt werden. Ein Indiz, das auf diese Annahme hindeutet, ist die Laktatproduktion der Zellen. Während die nicht adaptierten Zellen eine typische Laktatproduktion in der exponentiellen Phase und einen Verbrauch in der stationären Phase [100] aufweisen, produzieren die adaptierten Zellen über den gesamten Prozesszeitraum Laktat (**Abbildung 3-22**). Durch die Bildung des Nebenprodukts Laktat wird dem Prozess Energie entzogen, die bei der Bildung des Produkts fehlt.



**Abbildung 3-22: Verlauf der Laktatkonzentration des Klons P3F10.** Die nicht adaptierten Zellen weisen einen typischen Verlauf der Laktatkonzentration auf, die zunächst in der exponentiellen Phase steigt und in der stationären Phase wieder sinkt. Die adaptierten Zellen produzieren über den gesamten Produktionsprozess Laktat.

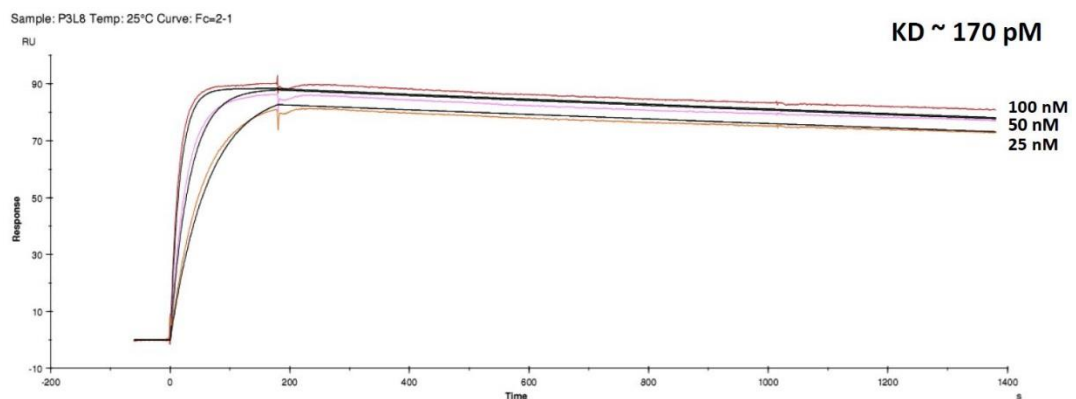
Durch diese Zelllinienentwicklung wird deutlich, dass die bei der Transfektion und der darauf folgenden Integration der Plasmid-DNA in das Genom der Wirtszelle, viele sehr unterschiedliche Zellklone entstehen. Diese unterscheiden sich nicht nur im Wachstum sondern auch sehr stark in der Produktivität. Um einen möglichst guten Zellklon herauszuarbeiten, ist es notwendig sehr viele Klone zu untersuchen. Im **Ausblick** dieser Dissertation wird vertieft auf diese Thematik eingegangen.

Der beste Zellklon P3L8 erreichte eine Produktkonzentration von 160 mg/L. Die Vergleichbarkeit mit anderen Prozessen aus der Literatur gestaltet sich jedoch schwierig, da scFv-Fragmente für gewöhnlich keine Glykosylierung aufweisen und somit häufig aus Kostengründen in prokaryotischen Produktionssystemen hergestellt werden. Der häufigste Produktionsorganismus ist das Bakterium *Escherichia coli* (E.coli). Produktionsprozesse mit E.coli können zu sehr hohen Produkttitern (1,2 g/L) führen, wobei die hohe Produktkonzentration aus einer sehr hohen Zellkonzentration, die die Zellkonzentration in Zellkulturprozessen um ein Vielfaches übersteigt, resultiert [101, 102].

Im Vergleich zu den Schüttelkolbenversuchen dieser Promotion können, auch bei eukaryotischen Produktionssystemen, in geregelten Reaktorsystemen

durch eine pH-Regelung und Regelung anderer Parameter wie z.B.  $pO_2$  und  $pCO_2$  eine höhere Zelldichte der CHO-Zellen und eine längere Prozessdauer und somit auch eine höhere Produktkonzentration erreicht werden.

Neben der Quantität ist auch die Qualität des Produktes von enormer Wichtigkeit, da das Produkt bei der Behandlung von Lebewesen eine aktive Wirkung aufweisen muss. Bei Antikörper steht die Bindungsaffinität zum Antigen im Mittelpunkt der Funktionalität. In diesem Fall wurde die Affinität extern über die Messung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) bestimmt.



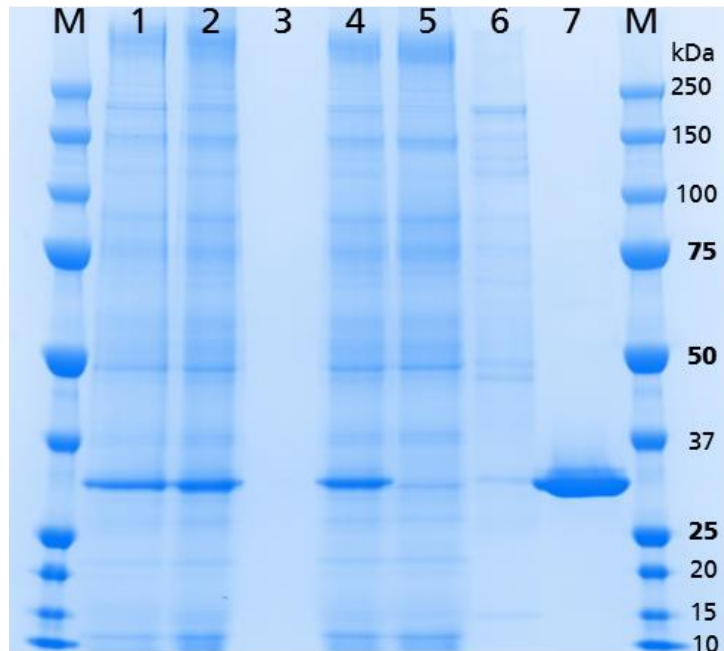
**Abbildung 3-23: Verlauf der Affinitätsbestimmung des Klon P3L8.** Aufgetragen ist die „response“ über die Zeit bei einer Temperatur von 25°C.

Die Messungen wurden mit dem Biacore X100 der Firma *GE Healthcare Life Science* durchgeführt. Es wurde extern bestätigt, dass die Überstände beider hier in dieser Dissertation aufgeführten Klone aktives Protein beinhalten. Das Bindeverhalten entspricht mit einer  $K_D$  von  $1,7 \times 10^{-10}$  M beim Klon P3L8 und  $2,5 \times 10^{-10}$  M beim Klon P3F10 dem normalen Bindeverhalten des Proteins.

Da scFv-Fragmente dazu neigen Dimere oder Multimere zu bilden [103, 104], die die Bindung zu dem Antigen negativ beeinflussen können, wurde ebenfalls eine Größenausschlusschromatographie mit dem hergestellten Produkt durchgeführt, um ein Verhältnis der unterschiedlichen Formen zueinander zu ermitteln. **Abbildung 3-24** zeigt die einzelnen Schritte der vorangegangenen Aufreinigung des produzierten Produkts auf einem SDS-Gel aufgetragen. Der Kulturüberstand eines Fed-Batch-Prozesses (1) wurde zunächst durch eine Diafiltration konzentriert (2), um die Auftragszeit bei der nachgeschalteten *immobilized metal ion affinity chromatography* (IMAC) zu verkürzen. Das Filtrat der Aufkonzentrierung (3) weist, wie erwartet, keine Proteinbanden auf. In der

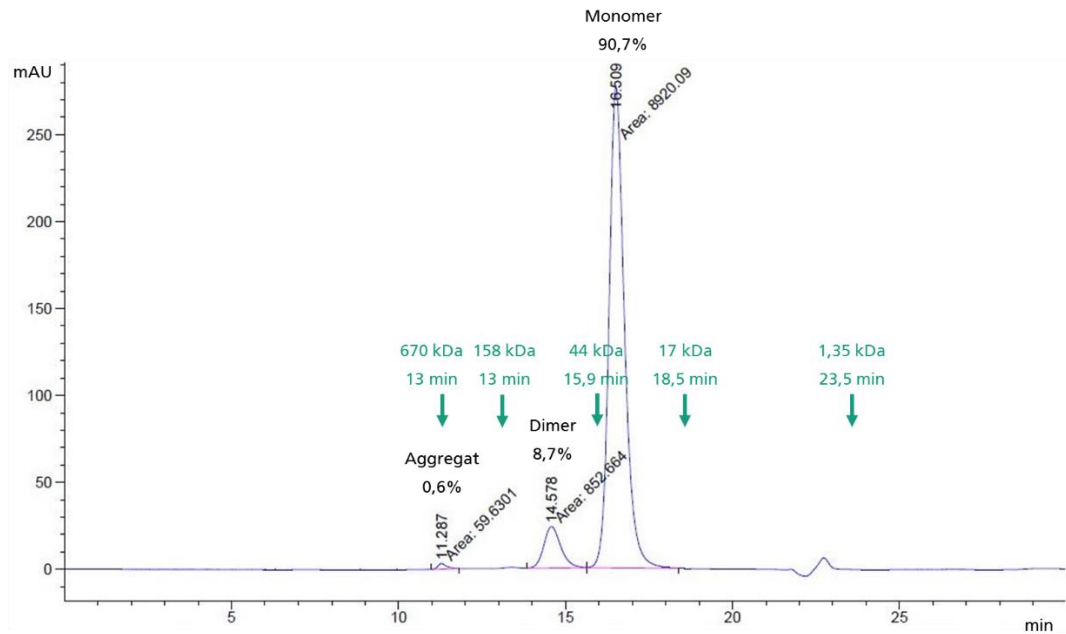


IMAC-Säule bindet das His-Tag des produzierten Moleküls an immobilisierten Nickelmolekülen, sodass im Durchlauf (5) und im Waschschrift (6) fast kein Produkt enthalten ist. Im Elutionsschritt (7) wird das Produkt wieder von der Säule gelöst.



**Abbildung 3-24: SDS-Gel der Aufarbeitung des scFv-Fragments.** Auf dem Gel sind die unterschiedlichen Fraktionen der Aufreinigung aufgetragen. **M** Marker; **1** Überstand der Kultivierung; **2** Aufkonzentrierter Überstand (Retentat); **3** Filtrat der Aufkonzentrierung; **4** Auftrag auf die IMAC Säule; **5** Durchlauf der Säule; **6** Waschschrift; **7** Elution

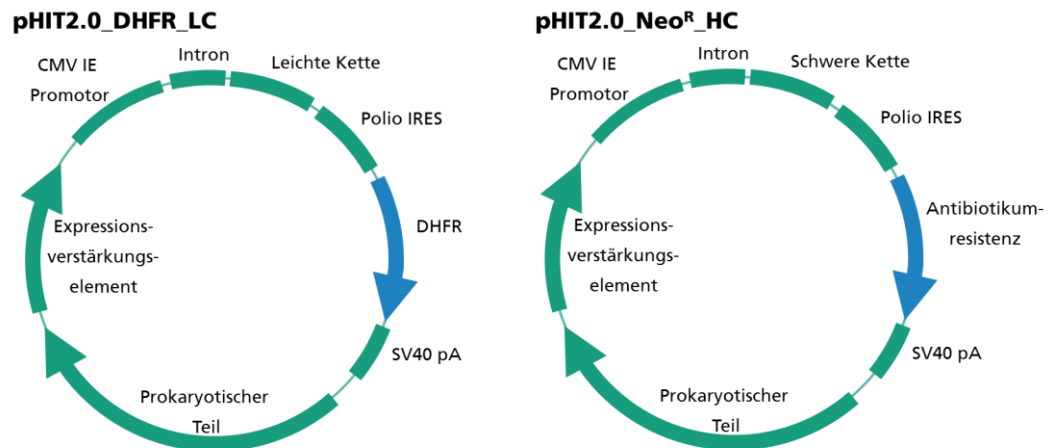
Mit dem so aufgereinigten Produkt wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt (**Abbildung 3-25**). Die untersuchte Probe wies einen Monomeranteil von über 90% auf, was mit den Daten einer kommerziellen Zelllinie, die das gleiche Produkt exprimiert, übereinstimmt. Neben dem Monomerpeak bei 16,509 min treten auch ein Dimerpeak bei 14,578 min und ein unspezifischer Aggregatpeak bei 11,287 min auf. Diese charakteristischen Peaks treten oft bei der Produktion von scFv-Fragmenten auf [105, 106]. Am Ende des Laufes, zwischen Minute 22 und 23, ist ein Pufferpeak zu sehen, der durch die Bestandteile des Laufpuffers zu Stande kommt.



**Abbildung 3-25: Ergebnis der SEC.** Aufgetragen ist das Signal einer UV-Messung in milli absorption units (mAU) über die Zeit in Minuten, die die Moleküle zum Durchlaufen der SEC-Säule benötigen. Der höchste Peak bei 16,509 Minuten entspricht dem Monomer des scFv-Fragments. Ein Dimerpeak ist bei 14,578 Minuten zu sehen. Die Zuordnung der Peaks wurde über die Verwendung eines Standardgemisches, das hier in grün eingezeichnet ist, vorgenommen. Der Peak bei 11,287 Minuten ist durch große unspezifische Aggregate und der Peak am Ende des Laufes durch Bestandteile des Laufpuffers zu erklären.

### 3.3.2. Zelllinienentwicklung Antikörper (Immunglobulin G)

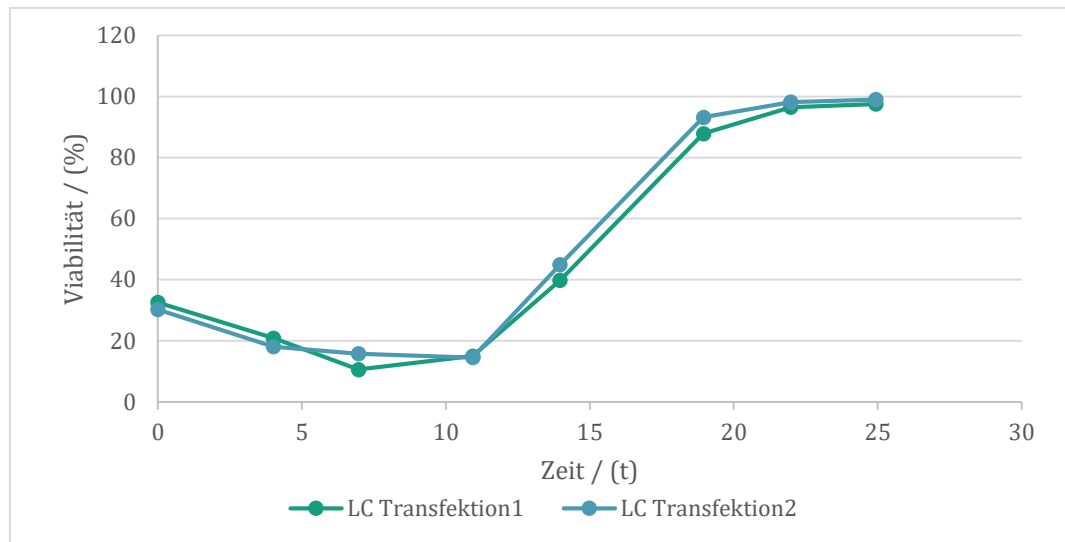
Die zweite Zelllinie, die mit der neuen Produktionsplattform entwickelt werden sollte, war eine Immunglobulin G (IgG) exprimierende Zelllinie. Die Besonderheit gegenüber dem scFv-Fragment ist, dass ein Antikörper aus zwei Domänen besteht und somit zwei separate Gensequenzen exprimiert werden müssen.



**Abbildung 3-26: Plasmide der Antikörperexpression.** Die Plasmide sind gleich aufgebaut wie die vorher verwendeten Plasmide. Das Plasmid pHIT2.0\_DHFR\_LC exprimiert sowohl die leichte Kette des Antikörpers, als auch DHFR als Selektionsgen. Das Plasmid pHIT2.0\_Neo<sup>R</sup>\_HC exprimiert die schwere Kette des Antikörpers und ein Neomycinresistenzgen als Selektionsgen.

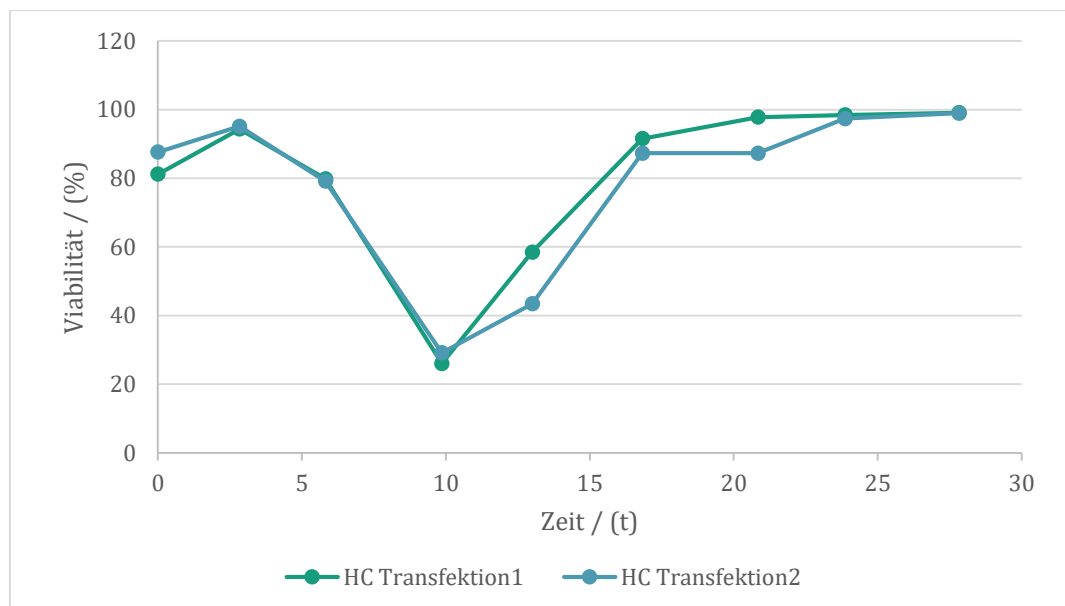
Die leichte Kette des Antikörpers wurde dabei von einem Plasmid exprimiert, dass das DHFR-Gen als Selektionsgen enthält. Die leichte Kette muss bei einer Antikörperexpression im Überschuss vorliegen, da diese bei der Faltung der schweren Kette beteiligt ist [107, 108]. Durch das DHFR-Gen kann die leichte Kette durch Zugabe von MTX amplifiziert werden. Die schwere Kette wird von einem Plasmid exprimiert, dass eine Antibiotikumresistenz als Selektionsgen enthält (**Abbildung 3-26**). Die Transfektionen wurden nacheinander durchgeführt.

Die erste Transfektion wurde mit dem Plasmid pHIT2.0\_DHFR\_LC durchgeführt. Die Selektion lief wie bei der ersten Zelllinienentwicklung unter 3.3.1 ab. Die Viabilität der Zellen ist mit ca. 30% von Beginn an sehr niedrig und sinkt durch den Selektionsdruck noch bis auf 10% ab. Die Selektion war nach 25 Tagen mit einer Viabilität von über 99% abgeschlossen (**Abbildung 3-27**) und die Zellen wurden kryokonserviert. Die so entstandenen Zelllinien trugen die Bezeichnungen HITB7\_LC.TF1 und HIT\_LC.TF2.



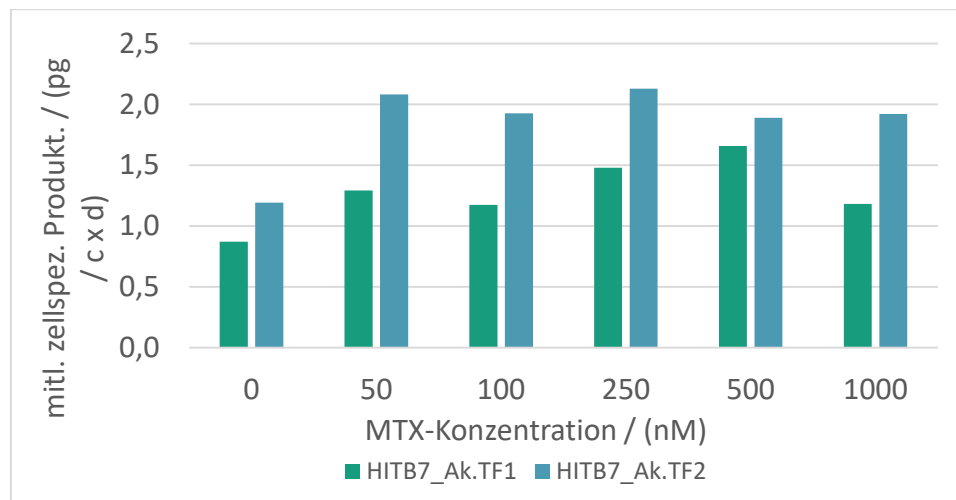
**Abbildung 3-27: Verlauf der Viabilität der ersten Selektion.** Die Viabilität bei der Selektion startete bei ca. 30% und sank in beiden Ansätzen unter 15%. Nach 25 Tagen war die Selektion mit einer Viabilität von über 99% abgeschlossen.

Die zweite Transfektion wurde mit dem Plasmid pHIT2.0\_Neo<sup>R</sup>\_HC durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen aus der ersten Selektion aufgetaut und nach zwei Passagen transfiziert. Die Zellen wiesen nach der Transfektion eine Viabilität von mehr als 80% auf, was darauf schließen lässt, dass die Zellen, die DHFR enthalten, robuster gegenüber dem Stress der Transfektion sind. Bei der Selektion ist die Viabilität auf ca. 30% gesunken und nach 28 Tagen wieder auf über 98% gestiegen (**Abbildung 3-28**), sodass die zu diesem Zeitpunkt kryokonserviert werden konnten.



**Abbildung 3-28: Verlauf der Viabilität der zweiten Selektion.** Die Viabilität bei der Selektion startete bei über 80% und sank in beiden Ansätzen unter 30%. Nach 28 Tagen war die Selektion mit einer Viabilität von über 98% abgeschlossen.

Mit den so entstandenen Zelllinien HITB7\_Ak.TF1 und HITB7\_Ak.TF2 wurde eine stufenweise Amplifikation mit den MTX Konzentrationen 50nM, 100nM, 250nM, 500nM und 1000nM vorgenommen. Anschließend wurde ein standardisierter Fed-Batch mit den unterschiedlichen Amplifikationsstufen vorgenommen. Auffällig war hierbei, dass alle Ansätze der Transfektion 1 ein schlechteres Wachstum und eine schnellere Abnahme der Viabilität über den Prozesszeitraum aufwiesen.



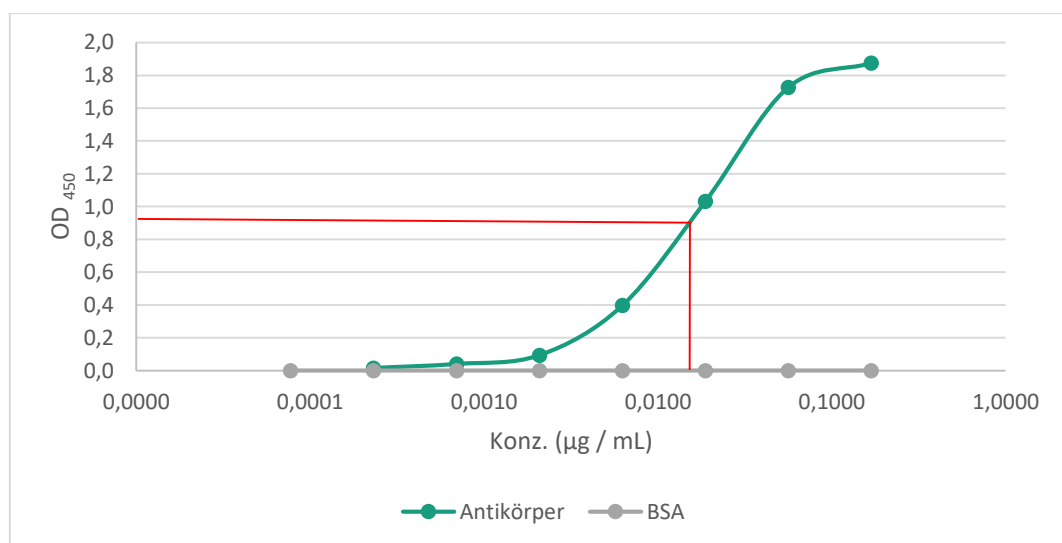
**Abbildung 3-29: Mittlere zellspezifische Produktivität der Antikörper (Ak) exprimierenden Zellen.** Die mittlere zellspezifische Produktivität lag bei beiden unamplifizierten Transfektionsansätzen bei ca. 1 pg/cxd und konnte nur in der ersten Amplifikationsstufe bei dem zweiten Transfektionsansatz auf ca. 2 pg/cxd gesteigert werden.

Die mittlere zellspezifische Produktivität hat sich nur bei dem zweiten Transfektionsansatz und nur im ersten Amplifikationsschritt signifikant von 1,2 auf 2,1 pg/cxd erhöht (**Abbildung 3-29**). Bezogen auf die Produktkonzentration des zweiten Transfektionsansatzes konnte die Expression von ca. 80 mg/L auf 140 mg/L (HPLC) gesteigert werden. Die weiteren Amplifikationsschritte haben zu keiner weiteren Steigerung der Produktivität geführt. Beim ersten Transfektionsansatz wurde bis einschließlich der Amplifikation mit 500nM nur eine leichte Steigerung der mittleren zellspezifischen Produktivität verzeichnet, die bei der Amplifikationsstufe mit 1000nM MTX jedoch nicht mehr vorhanden war. Die Amplifikation der leichten Kette eignet sich demnach nur zu einem gewissen Grad für eine Steigerung der gesamten Antikörperexpression. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit Ergebnissen aus der Literatur, die die leichte Kette

ebenfalls im Überschuss exprimiert haben, die Produktivität aber durch die Expression der schweren Kette limitiert war [109]. Eine Möglichkeit beide Domänen zu amplifizieren ist die Co-Transfektion beider Plasmide zur selben Zeit. Die Integration der beiden Plasmide geschieht bei einer Co-Transfektion oft an einem Ort der genomischen DNA [110], sodass bei einer Amplifikation sogar beide GOIs amplifiziert werden können. Bei der Durchführung der Selektion dieses Versuches ist die Viabilität der Zellen jedoch innerhalb von 14 Tagen auf 0 % gesunken, sodass der Versuch abgebrochen werden musste. Der Druck, der durch das Selektionsantibiotikum und die Abwesenheit des HT-Zusatzes entsteht, scheint zu stark für die bereits durch die Elektroporation geschwächten CHO-Zellen zu sein.

Eine andere Möglichkeit beide Domänen im Genom der Wirtszelle zu amplifizieren, ist die Expression beider Antikörpersequenzen von einem Plasmid (**siehe 3.3.3**).

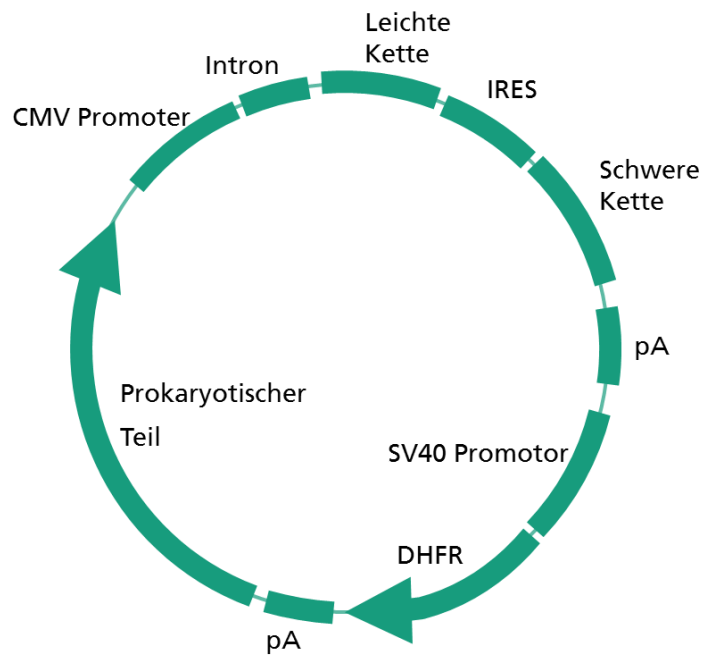
Neben der Steigerung der Produktivität ist wichtig, dass die produzierten Antikörper ihre Aktivität behalten. Die Aktivität wurde mithilfe eines indirekten *capture* ELISA und dem spezifischen Antigen nachgewiesen. Die mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) des Antikörpers beträgt ungefähr 18 ng/mL und damit im Normalbereich eines Antikörpers. Neben den Überständen wurde als Negativkontrolle eine Titration mit *bovinem serum albumin* (BSA) durchgeführt.



**Abbildung 3-30: Verlauf der capture ELISA-Ergebnisse.** Der Überstand eines Fed-Batches wurde in den Verdünnungsstufen  $1:\sqrt{10}$  in einem capture Elisa analysiert. Die Titration wurde mit dem spezifischen Antigen und als Negativkontrolle mit bovinem serum albumin (BSA) durchgeführt.

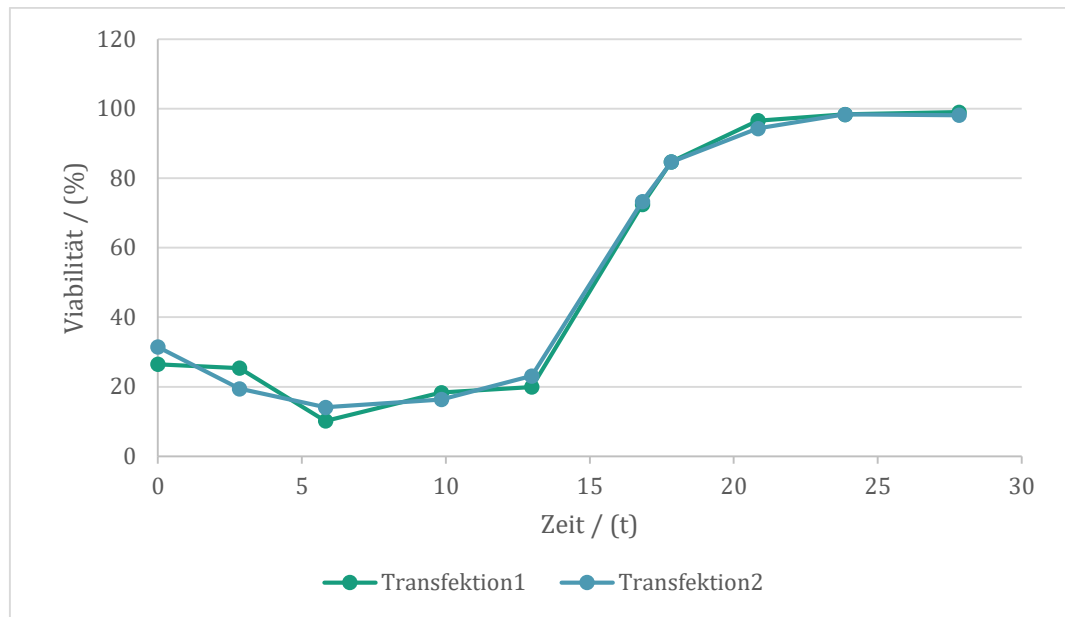
### 3.3.3. *All-in-one* Plasmid für Antikörper

Die Idee beide Antikörperdomänen von einem Expressionsplasmid zu exprimieren, erfordert eine Umstrukturierung der einzelnen Sequenzen auf dem Plasmid. Leichte und schwere Kette sollen, in dieser Reihenfolge, verbunden über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) von einer *messenger* RNA (mRNA) exprimiert werden. Das Selektionsgen DHFR wird dabei von einem separaten Promotor exprimiert (**Abbildung 3-31**).



**Abbildung 3-31: Aufbau des *all-in-one*-Plasmids.** Beide Antikörperdomänen werden, verbunden über eine Interne Ribosomale Eintrittsstelle (IRES), von einer mRNA exprimiert. Das DHFR-Gen wird von einem separaten Simian-Virus 40 (SV40) Promotor exprimiert.

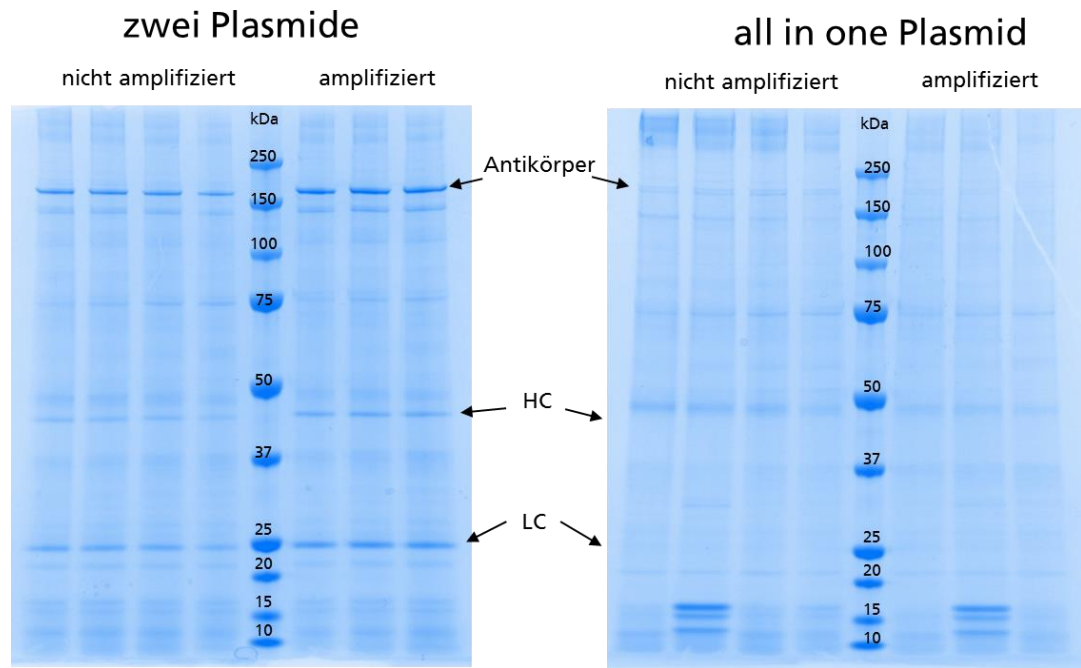
Die Transfektion und Selektion wurde durchgeführt wie unter **3.3.1** beschrieben. Die Viabilität bei der Selektion hat den gleichen Verlauf wie bei den vorangegangenen Zelllinienentwicklungen.



**Abbildung 3-32: Verlauf der Viabilität bei der Selektion der all-in-one ZLE.** Nach der Transfektion liegt die Viabilität der Zellen bei ca. 30% und sinkt im Zuge der Selektion auf 10-14% um dann wieder auf über 99% zu steigen.

Die anschließende Amplifikation mit 50 nM MTX verlief ebenfalls wie bei den vorangegangenen Amplifikationen. Die Analyse des Überstands eines Fed-Batch-Versuchs, durch die die Produktivität herausgefunden werden sollte, führte in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) jedoch zu dem Ergebnis, dass der Antikörper nicht exprimiert wurde. Zusätzlich zu der HPLC wurden die Überstände mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) untersucht. In **Abbildung 3-33** sind zwei SDS Gele im Vergleich dargestellt. Auf der linken Seite sind Überstände einer Kultivierung von Zellen, bei denen die ZLE mit zwei Plasmiden vorgenommen wurde. Gezeigt werden nicht amplifizierte Überstände und Überstände von Zellen, bei denen eine Amplifikation mit 50nM MTX vorgenommen wurde. Auf der rechten Seite sind Überstände von Zellen, die mit einem Plasmid (all-in-one) entwickelt wurden, aufgetragen. Die markanten Banden des Antikörpers und sowohl der schweren, als auch der leichten Kette, sind markiert.





**Abbildung 3-33: SDS-Gele von Zellüberständen einer Antikörper Produktion.** Links sind die Überstände einer Produktion mit zwei Plasmiden zu sehen. Neben der Produktbande knapp über 150 kDa sind auch die Banden der schweren Kette (HC) leicht unterhalb von 50 kDa und der leichten Kette (LC) bei 25 kDa zu erkennen. Das rechte Gel zeigt Überstände der Produktion mit dem all-in-one Plasmid. Hier sind keine Produktbanden zu erkennen.

Bei der ZLE mit zwei Plasmiden ist auf dem SDS Gel zu erkennen, dass die Intensität der Antikörperbande durch die Amplifikation zunimmt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den HPLC-Daten. Laut HPLC konnte die Produktkonzentration im Überstand von ca. 80 mg/L auf 140mg/L gesteigert werden. Bei dem Ansatz mit dem *all-in-one* Plasmid sind keine produktspezifischen Banden auf dem SDS-Gel zu erkennen.

Die nicht vorhandene Expression des Antikörpers kann durch ein ungünstiges Verhältnis zwischen leichter und schwerer Kette des Antikörpers zustande kommen. Jostock et al. [111] haben herausgefunden, dass ein Verhältnis von 2:1 zwischen leichter und schwere Kette zu einer optimalen Expression führt. Bereits eine geringe Abweichung von diesem Verhältnis kann zu einer dramatischen Abnahme der Produktion führen. Diese Ergebnisse scheinen aber nicht auf die vorliegende Problematik zuzutreffen, da zumindest die leichte Kette auf dem SDS-Gel zu sehen sein müsste, da sie von der Zelle sekretiert werden [112].

Der Fehler kann einen molekularbiologischen Ursprung haben. So kann es sein, da das Selektionsgen DHFR über einen separaten Promotor exprimiert wird,

dass das Plasmid so integriert, dass die Expressionskassette der leichten und schweren Kette zerstört wird. So könnten die Zellen die Selektion überleben, da sie das DHFR Gen exprimieren, das Produkt jedoch nicht. Diese Theorie scheint am wahrscheinlichsten, da keine der beiden Ketten exprimiert wird. Um diese Theorie zu bestätigen könnte man eine *ligation-mediated* PCR [113] durchführen, mit der es möglich ist den Integrationsort zu bestimmen. So könnte man von der entsprechenden Sequenz eine Sequenzierung vornehmen und überprüfen, wie das Plasmid in das Genom der Zelle eingebaut wurde.

### 3.3.4. Vergleich der Plattformen

Der Vergleich der beiden Plattformen ist im Poolstadium nur bedingt möglich, da die Daten der HIT-Plattform in einfachen Batch-Versuchen generiert wurden. Die Daten der HITB7-Plattform hingegen wurden in Fed-Batch-Versuchen generiert.

Bezogen auf die Klone ist die Produktivität der aus der HIT-Plattform hervorgegangenen Zelllinien höher als bei der, in dieser Dissertation entwickelten, HITB7-Plattform. Dieser Unterschied ist dadurch zu erklären, dass die HIT-Plattform inzwischen für Kundenprojekte eingesetzt wird und somit eine höhere Anzahl an Klonen *gescreent* werden kann. Die *screening*-Methode wird im **Ausblick** dieser Arbeit ausführlich diskutiert.

**Tabelle 3-2: Produktivitäten der Plattformen-Zelllinien im Poolstadium und als Klon.**

		<b>Pool</b> Produkt / (mg/L)	<b>Klon</b> Produkt / (mg/L)
HIT-Plattform	scFv-Fragment	48*	261
	Antikörper	41*	946
HITB7-Plattform	scFv-Fragment	127	160
	Antikörper	140	N/A

Die mit \* gekennzeichneten Werte wurden durch einen Batch-Prozess, alle anderen Werte durch einen standardisierten Fed-Batch-Prozess generiert.

Ausschlaggebend für diese Promotionsarbeit und die gesetzten Ziele ist, dass eine Produktionsplattform auf Basis des DHFR/MTX-Systems entwickelt wurde, mit der es möglich ist die Produktivität der Produktionszelllinien durch Zugabe von Methotrexat zu steigern. Die maximale dabei eingesetzte Konzentration von 250 nM MTX (bei dem scFv-Fragment) kann weiter gesteigert werden, wodurch die Möglichkeit besteht, die Produktivität weiter zu erhöhen. Die entstandene Produktionsplattform ist somit ein guter Grundstein für eine Herstellung von APIs, bedarf jedoch weiterer Optimierungen.

## 4. Ausblick

### 4.1. Plasmidoptimierung

Mit der Anfertigung dieser Dissertation ist es gelungen eine Produktionsplattform zu generieren, mit der es möglich ist therapeutische Proteine in guter Qualität und ausreichender Quantität herzustellen. Die Produktivität der aus dieser Plattform entstandenen Produktionszelllinien kann durch Zugabe von Methotrexat, einer Chemikalie aus der Krebsmedizin, zu dem Zellkulturmedium, erhöht werden. Der gescheiterte Versuch beide Domänen eines Antikörpers von einem Plasmid zu exprimieren zeigt, dass die entstandene Plattform molekularbiologisch optimiert werden muss. Da das Verhältnis der leichten zur schweren Kette eine entscheidende Rolle bei der Expression des Antikörpers spielt, könnte ein anderes IRES-Element ausprobiert werden [111, 114]. Alternativ könnte das IRES-Element durch ein 2A/furin ersetzt werden, was beide Domänen zu einem offenen Leseraster (ORF) zusammenfasst und durch eine spätere Prozessierung im Endoplasmatischen Retikulum durch die Wirtszelle zu einem funktionalen Antikörper führt [115].

Für eine allgemeine Plasmidoptimierung können molekularbiologische Elemente wie die *matrix attachment regions* (MAR) [116, 117], durch die eine stabile und hohe Expression gewährleistet werden soll, in das Expressionsplasmid eingebaut werden [118]. Diese Elemente heften sich an die Matrix des Zellkerns und halten den genetischen Abschnitt so für die Expression offen [119].

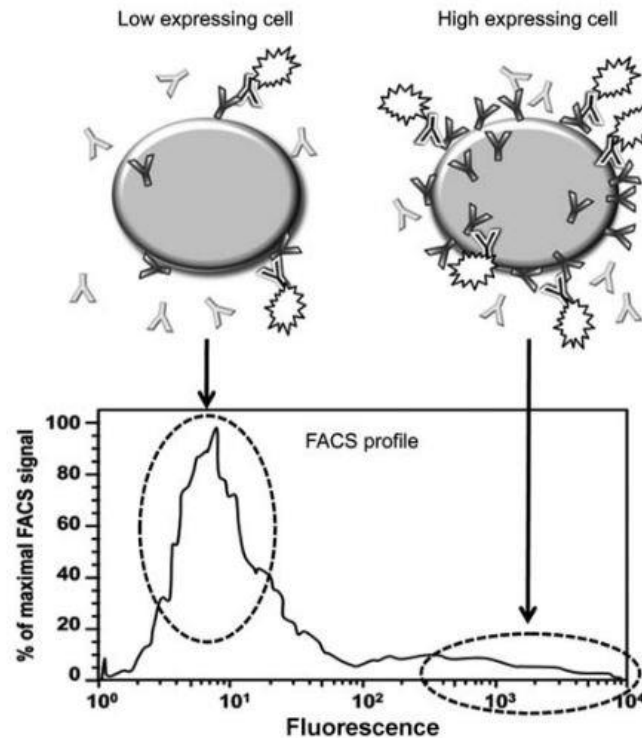
### 4.2. Screening

In dieser Dissertation wurde ebenfalls gezeigt, dass Transfektionsansätze bezüglich der Produktivität stark variieren (**0**), was z.B. durch die Kopienzahl und den Integrationsorten der Produktionsplasmide im Wirtsgenom zustande kommen kann. Daher ist es für die Entwicklung eines Hochproduzentenzellklon zu empfehlen möglichst viele Transfektionsansätze durchzuführen. Die erreichten Produktivitäten der entstandenen Zellklone bewegten sich dabei im dreistelligen Milligramm-Bereich. Dabei ist zu beachten, dass auf Grund des großen zeitlichen und finanziellen Aufwands

lediglich 10-20 Klone pro ZLE auf die wichtigen Parameter untersucht wurden. Ein Zellpool besteht jedoch aus sehr vielen verschiedenen Klonen, wovon nur die wenigsten eine sehr hohe Expression aufweisen. Um diese Klone zu isolieren sollte eine Großzahl an Einzelzellklonen aus dem besten Transfektionsansatz auf ihre Produktivität und die Qualität des Produktes untersucht werden. Das sogenannte *screening* ist ein sehr kosten- und zeitintensiver Prozess, dennoch sollte vor der Klonauswahl unbedingt ein Fed-Batch-Prozess mit den Klonen durchgeführt werden, da hier die Produktivität um ein vielfaches höher sein kann, als bei einem einfachen Batch-Prozess.

In dieser Dissertation wurden mit den Einzelzellklonen Fed-Batch-Prozesse im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt und anschließend die Produktkonzentration und die daraus resultierende mittlere zellspezifische Produktivität bestimmt. Durch diese zeitaufwendige Methode konnten nur sehr wenige Klone untersucht werden. Es muss also eine Methode etabliert werden, mit der es möglich ist eine aussagekräftige Vorauswahl mit einem sehr hohen Durchsatz an Klonen durchzuführen.

Eine *screening*-Methode mit einem hohen Durchsatz nutzt die Durchflusszytometrie engl. *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) als Grundlage. Diese Methode vereint eine Vorauswahl der Klone aufgrund ihrer Produktivität mit der Einzelzellklonierung. Die produzierenden Zellen werden bei dieser Methode bei einer Temperatur von 0-4 °C gehalten, um die metabolischen Vorgänge der Zelle zu verlangsamen. Dadurch verbleiben produzierte Antikörper beim Sekretionsvorgang länger an der Oberfläche der Zellmembran und können dort durch fluoreszenzmarkierte Antikörper angefärbt werden [120]. Je nach Intensität des Farbsignals kann so die Produktivität abgeschätzt werden.



**Abbildung 4-1: Fluoreszenzsignal von produzierenden Zellen [121].** Ein Großteil der Zellen exprimiert den Antikörper in geringen Mengen, wodurch nur ein schwaches Fluoreszenzsignal entsteht. Die Zellen mit einer höheren Intensität werden als potentielle Hochproduzenten isoliert.

Eine Weiterentwicklung dieses Ansatzes ist die Verwendung von Stopcodons, die nicht immer ein Ende der Transkription einleiten. Diese sogenannten *leaky stop codons* (LSC) haben eine Effizienz von 98-99 % [122] und erlauben es, in 1-2 % der Transkriptionen eine Transmembrandomäne an dem Produkt anzuheften. Diese Transmembrandomäne sorgt dafür, dass das Produkt in der Membran der Zelle stecken bleibt.



**Abbildung 4-2: Aufbau der Expressionskassette mit leaky stop codon [123].** Die Transkription wird in 98-99% der Fälle durch das stop codon beendet. Geschieht dies nicht, so werden an die schwere Kette des Antikörpers eine Transmembrandomäne (TM) und eine cytoplasmatische Domäne (CY) angehängt. Antikörper mit diesen Domänen bleiben in der Membran der Zelle stecken, sodass der Antikörper auf der Oberfläche der Zelle präsentiert wird.

Antikörper, die so an die Membran der Zelle angeheftet sind, können, wie bei der vorangegangenen Methode, durch fluoreszenzmarkierte Antikörper angefärbt werden. Somit müssen die Zellen nicht heruntergekühlt werden, um sie anfärben zu können.

Auf Basis dieser Methode könnte man eine weitere Verbesserung und Vereinfachung des *Screenings* vornehmen. Anstatt eine Transmembrandomäne an die schwere Kette des Antikörpers anzuheften, könnte man ein grün fluoreszierendes Protein anfügen. Somit würde 1-2 % des exprimierten Produkts grün fluoreszieren und mit dem FACS detektierbar sein.



**Abbildung 4-3: Expressionskassette der schweren Kette mit einem GFP.** Das *leaky stop codon* sorgt dafür, dass an 1-2 % der exprimierten schweren Ketten ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) angehängt ist.

Die so entstehenden Antikörper mit einem angehängten GFP könnten bei einer späteren Aufarbeitung des Produkts durch eine Größenausschlusschromatographie (SEC) vom eigentlichen Produkt abgetrennt werden. Bei dieser *screening*-Methode wäre der Arbeitsaufwand im Gegensatz zu den vorangegangenen Methoden wesentlich geringer. Ein Anfärben mit einem anderen Antikörper könnte so vermieden werden.

### 4.3. Produktionsplattform

Die entstandene Produktionsplattform besteht zurzeit aus Zelllinien und Plasmiden, die für die Expression von therapeutischen Proteinen eingesetzt werden können. Um eine optimale Produktion in Bezug auf Qualität und Quantität zu gewährleisten, wird derzeit ein auf die Zelllinie abgestimmtes Zellkulturmedium entwickelt. Zudem wird ein Standard Produktionsprozess entwickelt, der durch nur kleine Anpassungen, schnell zu einem stabilen Produktionsprozess führen soll.

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Material

#### 5.1.1. Chemikalien und Pufferlösungen

*Tabelle 5-1 Chemikalien und Pufferlösungen*

Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
Agarose	11404	Serva
Agarose	214010	Becton Dickinson (BD)
BSA	23209	Thermo Scientific
Dikaliumhydrogenphosphat	1.05101	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	1.06580	Merck
Ethanol 96% vergällt	85829.360	VWR
Ethanol 99% ROTIPURAN®	9065.1	ROTH
Glucosemonohydrat	131311	Merck
Hefeextrakt	212750	Becton Dickinson (BD)
Imperial Protein Stain	24615	ThermoFisher Scientific
Isopropanol	8067	J.T. Baker
Kaliumdihydrogenphosphat	1.04877.1000	Merck
L-Glutamin	HN08.2	Roth
Natriumazid	30175	Serva
Natriumcarbonat	8563.1	Roth
Natriumchlorid	39571	Roth
Natriumchlorid	1.06400	Merck
Natriumhydrogencarbonat	HN01.1	Roth
Natriumhydroxid 5 M	1.37041	Merck
Natriumhydrogenphosphat Monohydrat	1.06346	Merck
NuPAGE® MOPS SDS Bufferkit	NP0050	ThermoFisher Scientific
NuPAGE® Novex 4-12% Protein Gel	NP0322BOX	ThermoFisher Scientific
peqGREEN	732-3196	Peqlab
PBS	Lonza	BE17-516Q
Precision Plus All Blue Marker	161-0373	BioRad



<b>Bezeichnung</b>	<b>Artikelnr.</b>	<b>Hersteller</b>
Propidiumjodid	P3566	Molecular Probes
Salzsäure (HCl) 6M	1.10164	Merck
Schwefelsäure	1.00731	Merck
Super Block T20	37516	ThermoFisher Scientific
TAE-Puffer (50x)	4441250	VWR
TMB (3,3',5,5'-tetramethybenzidine)	ES001	Millipore
Trypanblau	SigmaAldrich	93595-250ml
Trypton	211705	Becton Dickinson (BD)
Tween 20	P1379	SigmaAldrich

### 5.1.2. Antikörper, Enzyme und Reaktionspuffer

*Tabelle 5-2 Enzyme und Reaktionspuffer*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Artikelnr.</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-human-IgG-HRP	172-1050	Biorad
EcoRI	FD0274	Thermo Scientific
FD Green Buffer	B72	Thermo Scientific
HindIII	FD0504	Thermo Scientific
MluI	FD0564	Thermo Scientific
NheI	FD0973	Thermo Scientific
OneTaq DNA Polymerase Kit	M0480L	NEB
Sall	FD0644	Thermo Scientific
T4 Ligase	EL0011	Thermo Scientific
T4 Ligase Puffer	EL0011	Thermo Scientific
XhoI	FD0694	Thermo Scientific

### 5.1.3. Geräte

*Tabelle 5-3 Geräteliste*

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Chromatographienalage	Äkta pure	GE
Durchflusszytometer	GUAVA easyCyte™	Merck-MILLIPORE
Geldokumentationssystem	IX	INTAS
Elektrophoresekammer	Blue Marine 100	SERVA Electrophoresis
Elektrophoresekammer	XCell Sure Lock	ThermoFisher Scientific
Elektrophoresenetztteil	Std. Power Pack P25	Biometra
Elektrophoresenetztteil	PS300-B	Hoefner
Gefrierschrank	Premium NoFrost	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Herafreeze HFU T	Thermo Scientific
Gefrierschrank -150°C	VIP Plus	Panasonic
Gluc. Lac. Messgerät	YSI 2700 Select	YSI Life Sciences
Gluc. Lac. Messgerät	YSI 2950	YSI Life Sciences
HPLC	Infinity 1200 Series	Agilent Technologies
Kolbenhubpipette	0,5-10mL	Eppendorf
Kolbenhubpipette	10-100mL	Eppendorf
Kolbenhubpipette	100-1000mL	Eppendorf
Kühlschrank	profi line FKS-5002-20	Liebherr
Mikrowelle	9024E	privileg
Multikanalpipette	Xplorer 300 µL	Eppendorf
Multikanalpipette	Xplorer plus 1200µL	Eppendorf
Osmometer	K-7400	Knauer GmbH
pH, pO <sub>2</sub> , pCO <sub>2</sub> Messgerät	pHOX	Bioprofile
Photometer	Biophotometer 6131	Eppendorf
Sterilwerkbank	MAXISAFE 2020	Thermo Scientific
Schüttelinkubator	New Brunswick S41i	Eppendorf
Thermoblock mit Schüttler	TMix	Analytik Jena
Thermoblock mit Schüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermoblock	Thermostat 5320	Eppendorf
Thermocycler	C1000	BioRAD
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf
Vortexer	Vortex	Bender & Hobein AG
Vortexer	VortexGenie2	Scientific Industries
Wasserbad	SW22	Julabo
Zellzähler	Cedex HiRes	Roche
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf
Zentrifuge	Centrifuge 5804R	Eppendorf

#### 5.1.4. Medien und Zusätze

*Tabelle 5-4 Medien und Zusätze*

Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
Ampicillin 50mg/mL	A5354	SigmaAldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D2650	SigmaAldrich
ExCellCHO Advanced	24366C	SigmaAldrich
ExCellCHO Advanced Feed	24368C	SigmaAldrich
Geneticindisulfat (G418) 50mg/mL	CP11.1	Roth
GlutaMAX	35050-038	Life Technologies
Hygromycin-B 50mg/mL	1287.2	Roth
HT Supplement	11067030	Thermo Fisher Scientific
Methotrexat (MTX)	3362608	Pfizer
ProCHO 5 serum-free media	12-766Q	Lonza

#### 5.1.5. Oligonukleotide

*Tabelle 5-5 Oligonukleotide*

Bezeichnung	Länge, bp	Sequenz
PR_0030	20	GGCACCTATTGGTCTTACTG
PR_0052	20	TTGACGCAAATGGGCGGTAG
PR_0066	30	AAAAGCTAGCTTTACTTGTACAGCTCGTCC
PR_0067	35	AAAACGCGTGAATTCAAGCGGCCAACTTAATTAA
PR_0068	30	AAACTCGAGTCACCGGATGGCCAATCCAA
PR_0069	29	AAAACGCGTTCAATATTGGCCATTAGCCA

Bezeichnung	Länge, bp	Sequenz
PR_0077	20	CGGCCGCAAGCAGCTGGCTA
PR_0078	20	GTCTTGTCCAGGCGCGCCAA
PR_0079	20	GCCAGTCTTGTGCTCCATTA
PR_0087	30	AAAAGCTAGCGCCACGTGTCTTGTCCAGAG
PR_0088	30	AAAAGAATTCTAACCGGTAGGGATCGAACC
PR_0089	30	AAAAGCTAGCAGAGGATCGAACCCTTATGC
PR_0090	30	AAAAGCTAGCTAACCGGTAGGGATCGAACC
PR_0095	30	AAAAGCTAGCCCGGTCGCCACCATGGTGAG
PR_0096	30	AAAAGAATTCTGGCCGCTTTACTTGTACAG
PR_0097	20	CAATACCGGAGTACTAGCCG
PR_0098	20	AAGTCCACCTCTGGCGGAAC
PR_0099	20	AGTGCAAGGTGTCCAACAAG
PR_0102	39	AAAATGCATGATATCTAGAATCAAGTAAAGCGGCCA AAC
PR_0116	30	AAAAGAATTTCGCTAACGCAGTCAGTGCTTC
PR_0117	30	AAAAGTCGACCAATACCGGAGTACTAGCCG
PR_0118	20	TCCGGAAGACTGGAAGAACC
PR_0119	20	ACGTGTGCTCAGGCTCCATC
PR_0120	20	GTCGTCCTCTACCTTCTCTG
PR_0121	20	AGAAACACTGCGTTAACAGG
PR_0124	30	AAAACGTACGAGAGGATCGAACCCTTATGC
PR_0125	30	AAAACGTACGGAAAGGAAGGCCCATGAGGC
PR_0126	30	AAAAGAATTTCGTCTTGTCCAGAGCTCGCCG

### 5.1.6. Plasmide/Vektoren

*Tabelle 5-6 Plasmide/Vektoren*

Bezeichnung	Charakterisierung	Ursprung
pHITbasisDHFR	CMV-Promotor, intronic Sequence, MCS, Polio- IRES, DHFR, pA	Fraunhofer ITEM
pHITbasisDHFR2.0	CMV-Promotor, intronic Sequence, MCS2.0, Polio- IRES, DHFR, pA	Fraunhofer ITEM
pHITbasisHygro	CMV-Promotor, intronic Sequence, MCS, Polio- IRES, Hygromycinresistenz, pA	Fraunhofer ITEM
pHITbasisHygro2.0	CMV-Promotor, intronic Sequence, MCS2.0, Polio- IRES, Hygromycinresistenz, pA	Fraunhofer ITEM
pHITbasisNeo	CMV-Promotor, intronic Sequence, MCS, Polio- IRES, Neomycinresistenz, pA	Fraunhofer ITEM
pHITbasisNeoGFP	CMV-Promotor, intronic Sequence, GFP, Polio-IRES, Neomycinresistenz, pA	Fraunhofer ITEM
pHITbasisNeo2.0	CMV-Promotor, intronic Sequence, MCS2.0, Polio- IRES, Neomycinresistenz, pA	Fraunhofer ITEM
pHITallinoneDHFR2.0	CMV-Promotor, intronic Sequence, MCS2.0, Polio- IRES, SV40-Promotor, DHFR, pA	Fraunhofer ITEM

### 5.1.7. Reaktionskits/Säulen

*Tabelle 5-7 Reaktionskits*

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue Kit	69504	QIAGEN
EndoFree Plasmid Maxi Kit	12362	QIAGEN
Sepharose 6 Fast Flow	17015901	GE
QIAprep Spin Miniprep Kit	27104	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	28704	QIAGEN
TSKgel G2000SW <sub>XL</sub>	0008540	Tosoh Bioscience

### 5.1.8. Verbrauchsmaterialien

*Tabelle 5-8 Verbrauchsmaterialien*

Bezeichnung	Model	Hersteller
ELISA Platte	MaxiSorp	Thermo Fischer
Minireaktoren	50mL	Corning
Multiwellplatte	24-Well	Corning
Multiwellplatte	96-Well	Corning
Multiwellplatte	384-Well	Corning
Pipettenspitzen	10µL	Eppendorf
Pipettenspitzen	100µL	Eppendorf
Pipettenspitzen	1000µL	Eppendorf
Probenfilter 0,45µm	Minisart	Sartorius
Reaktionsgefäße	1,5mL	Eppendorf
Reaktionsgefäße (steril)	1,5mL	Eppendorf
Reaktionsgefäße	2mL	Eppendorf
Reaktionsgefäße	2,0mL	Eppendorf
Schüttelkolben	125mL	Corning
Schüttelkolben	250mL	Corning
Schüttelkolben	500mL	Corning
Stabpipetten	2mL	Corning
Stabpipetten	5mL	Corning
Stabpipetten	10mL	Corning
Stabpipetten	25mL	Corning

<b>Bezeichnung</b>	<b>Model</b>	<b>Hersteller</b>
Sterilfilter	Sartopore 2	Sartorius
Sterilfilter	Millex-GP 50 mm	Millipore
Zentrifugenröhrchen	15mL	Corning
Zentrifugenröhrchen	50mL	Corning

### 5.1.9. Zelllinien

*Tabelle 5-9 Zelllinien*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Ursprung</b>
CHO-HIT	N/A	Fraunhofer ITEM
CHO-HITB7	N/A	Fraunhofer ITEM
E.coli Top 10	N/A	Fraunhofer ITEM

### 5.1.10. Software

*Tabelle 5-10 Software*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Version</b>	<b>Hersteller</b>
Chromas	2.5	Technelysium Pty Ltd
CloneManager Professional	9	Sci-Ed Software
Work Edit Cytosoft	3.6.1	Guava Technologies
Guava Express Software	3.6.1	Guava Technologies
Intas	GDS	Intas

## 5.2. Methoden

### 5.2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 5.2.1.1. Planung von Klonierungen und Sequenzierungen

Die Planung von Klonierungen und Sequenzierungen werden mit der Software Clonemanager 9 vorgenommen. Jede Klonierung wird zunächst virtuell und dann im Labor durchgeführt. Die Primer für die Sequenzierungen und PCR-Ansätze werden ebenfalls mit dieser Software vorgenommen.

#### 5.2.1.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR-Amplifikation ist es möglich DNA-Fragmente aus einem bestehenden Plasmid/Vektor zu amplifizieren. Den Enden der Primer können dabei Sequenzen angehängt werden, die von Restriktionsenzymen erkannt und geschnitten werden. Diese sogenannten Adapter kommen oft zum Einsatz, wenn ein bestimmter genetischer Abschnitt von einem Plasmid auf ein anderes übertragen werden soll.

Für die Amplifikation einer genetischen Sequenz mittels PCR werden zunächst alle für die Reaktion notwendigen Bestandteile in einem 1,5mL Reaktionsgefäß zusammengefügt.

*Tabelle 5-11 PCR-Ansatz*

Bestandteil	Pro Ansatz [µL]
5x OneTaq Standard Reaction Buffer	5
10 mM dNTPs	0,5
Forward Primer 10pmol/µL	0,5
Reverse Primer 10pmol/µL	0,5
OneTaq DNA Polymerase	0,1
Template DNA 1µg/µL	0,1
Nukleasefreies Wasser	18,3
<b>Gesamt</b>	<b>25</b>



Aus dem Gesamtansatz werden dann je 25 µL in PCR-Reaktionsgefäße überführt, die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt und das passende PCR-Programm gestartet.

*Tabelle 5-12 PCR-Programm*

<b>Amplifikationsphase</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Dauer [s]</b>	<b>Zyklen</b>
Initiale Denaturierung	94	30	
Denaturierung	94	30	
Primerhybridisierung	*	30	10
Elongation	68	**	
Denaturierung	94	30	
Primerhybridisierung	*	30	20
Elongation	68	**	
Finale Elongation	68	300	

Die Primerhybridisierungstemperatur\* wird immer 5 °C tiefer als die niedrigste Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) der beiden Primer gewählt. Die Elongationszeit\*\* richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Genabschnitts. Für je 1000 Basenpaare wird eine Laufzeit von 60 Sekunden gewählt.

#### **5.2.1.3. DNA-Verdau mittels Restriktionsenzym**

Das Schneiden von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen (Endonukleasen) kann für verschiedene Zwecke genutzt werden. Dabei entstehen Fragmente, die glatte, unspezifische (blunt ends) oder spezifische 3'/5' überhängende Enden (sticky ends), aufweisen.

In dieser Arbeit wurden Restriktionsverdaue vorgenommen, um Gensequenzen in Plasmide/Vektoren einzufügen und um Insertionen auf ihre Orientierung zu überprüfen.

*Tabelle 5-13 DNA-Verdau mittels Restriktionsenzym*

Bestandteil	Pro Ansatz [ $\mu\text{L}$ ]
10x FastDigest Green Puffer	2
Enzym 1	1
Enzym 2	1
Fast-AP	1
Plasmid-DNA/PCR-Amplifikat	2 $\mu\text{g}$
Nukleasefreies Wasser	X
Gesamt	20

In einem Ansatz kann mit mehreren Restriktionsenzymen verdaut werden. Dabei muss darauf geachtet werden, dass alle Enzyme den gleichen Puffer als Reaktionsumgebung benötigen. Zusätzlich kann noch eine Phosphatase (z.B. „Fast-AP“) hinzugegeben werden. Diese dephosphoryliert alle Arten von DNA-Enden und verhindert so eine Religation der geschnittenen Sequenzen. Die Menge an Wasser in dem Reaktionsansatz wird so angepasst, dass das Endvolumen 20  $\mu\text{L}$  beträgt.

Die Restriktionsansätze werden für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und können dann über ein Agarosegel aufgetrennt werden (5.2.1.4).

#### 5.2.1.4. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, mit der es möglich ist DNA-Fragmente ihrer Größe nach zu trennen. Hierbei wird die negativ geladene DNA auf einem Agarosegel aufgetragen und läuft in einem elektrischen Feld in Richtung Pluspol. Je nach Größe und Struktur der DNA-Fragment ergibt sich ein Bandenmuster, dass durch anfärben mit geeigneten Färbemitteln sichtbar gemacht werden kann. Anhand eines Markers (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder), der mit auf das Agarosegel aufgetragen wird, kann die Größe der einzelnen Fragmente bestimmt werden.

Für ein 1%tiges Agarosegel werden 2 g Agarose in 200 mL TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht, bis keine Schlieren mehr zu sehen sind. Zeitgleich wird eine Gelkammer vorbereitet und die benötigten Kämme eingesetzt. Das Agarosegel wird heiß in die Kammer gegossen und 2 $\mu\text{L}$

peqGreen Färbemittel hinzugegeben. Mit einem Kamm wird der Farbstoff durch Umrühren gleichmäßig verteilt. Sobald das Agarosegel fest geworden ist, wird es in die Elektrophoresekammer gelegt, die Kämme entfernt und mit TAE-Puffer bedeckt. Vor dem Auftragen wird zu den Proben die entsprechende Menge (6x) Loading Dye gegeben. Bei Proben aus einem Restriktionsverdau, bei denen der „FastDigest Green“ Puffer verwendet wurde, entfällt die Zugabe von Loading Dye. Die Auftrennung der Fragmente findet dann bei 100 Volt für 45 Minuten statt.

Anschließend wird mit einem Geldokumentationssystem ein Foto von dem Agarosegel aufgenommen. Wenn nötig können mit einem Skalpel Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA extrahiert werden.

### **5.2.1.5. Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird mit dem Reaktionskit „QIAquick Gel Extraction Kit“ vorgenommen. Hierbei wird nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Um eine möglichst hohe DNA-Konzentration zu erreichen, findet die Elution in 25 µL Wasser statt.

### **5.2.1.6. Ligation von DNA-Fragmenten**

Für die Ligation müssen das Plasmid und die einzufügende Gensequenz mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten werden oder glatte Enden vorliegen. Das molare Verhältnis von Plasmid zu Gensequenz sollte mindestens 1:3 betragen, um eine erfolgreiche Ligation zu erzeugen. Wenn die Ligation mit nur einer Enzymschnittstelle durchgeführt wird, muss nach der Liaktion die Orientierung der eingefügten Sequenz bestimmt werden. Dies kann durch einen Orientierungsverdau oder eine Orientierungs-PCR geschehen.

Um die Effizienz der Ligation zu bestimmen, kann ein Ansatz mit einer Religation durchgeführt werden. Hierbei wird dem Ligationsansatz kein Insert zugefügt, wodurch bestimmt werden kann, in welchem Maße das Plasmid religiert.

**Tabelle 5-14 Ligationsansatz**

Bestandteil	Pro Ansatz
10x T4 Ligase Puffer	2µL
Plasmid	20-100ng
Einzufügende Gensequenz	1:3 molares Verhältnis zum Plasmid
T4 Ligase (5 U/µL)	1
Nukleasefreies Wasser	X
Gesamt	20

**Tabelle 5-15 Religationsansatz**

Bestandteil	Pro Ansatz [µL]
10x T4 Ligase Puffer	2
Plasmid	20-100ng
T4 Ligase	1
Nukleasefreies Wasser	X
Gesamt	20

Die Ansätze werden wie vom Hersteller angegeben für 10 Minuten bei Umgebungstemperatur inkubiert. Anschließend kann eine Transformation in kompetente E.coli Bakterien vorgenommen werden (5.2.1.7).

#### **5.2.1.7. Transformation mittels Hitzeschock**

Plasmid-DNA kann in E.coli Bakterien vervielfältigt werden. Durch einen Hitzeschock, öffnen sich Poren in der Membran der Bakterien, durch die die Plasmid-DNA in das Zellinnere gelangen kann.

Die kompetenten E.coli Bakterien (je 50 µL) werden aus dem -70 °C Gefrierschrank entnommen und für ca. 10 Minuten auf Eis aufgetaut. Es werden dann 5µL eines Ligationsansatzes zu den Zellen gegeben und weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Reaktionsgefäße für 30 Sekunden bei 42 °C in einen Thermoblock inkubiert. Nach weiteren 2 Minuten auf Eis werden 950µL LB-Medium zu den Zellen gegeben. Es folgt eine Inkubation bei 37 °C für eine Stunde. Die

Zellsuspension wird dann in unterschiedlichen Volumina (meist 10 µL, 100 µL und 890 µL) auf LB-Agar Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Über Nacht (ca. 16 Stunden) werden die Platten dann bei 37 °C inkubiert.

#### 5.2.1.8. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine schnelle Methode, um E.coli Kolonien ausfindig zu machen, die das Plasmid mit der neu eingefügten Gensequenz enthalten. Hierbei wird Bakterienmaterial in einen PCR-Ansatz gegeben. Die Primer können vor und hinter der eingefügten Gensequenz liegen oder um die Orientierung herauszufinden, auf dem eingefügten Gen.

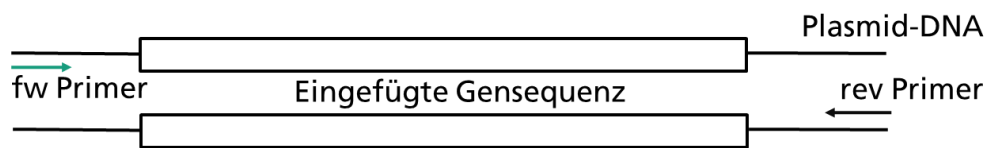


Abbildung 5-1 Prinzip der Kolonie-PCR

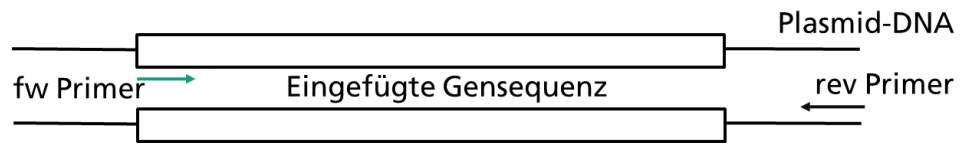


Abbildung 5-2 Prinzip der Kolonie-PCR mit Orientierungsbestimmung

Mit einer Pipettenspitze wird eine Kolonie von einer LB-Agarplatte aufgenommen und in einen PCR-Ansatz getaucht. Anschließend wird der Klon auf einer weiteren LB-Agarplatte abgelegt und beschriftet. So kann später von der PCR auf den Klon zurückgeschlossen werden.

Tabelle 5-16 Ansatz einer Kolonie PCR

Bestandteil	Pro Ansatz [µL]
5x OneTaq Standard Reaction Buffer	5
10 mM dNTPs	0,5
Forward Primer 10pmol/µL	0,5
Reverse Primer 10pmol/µL	0,5
OneTaq DNA Polymerase	0,1
Template DNA 1µg/µL	0,1
Nukleasefreies Wasser	18,3
Gesamt	25

*Tabelle 5-17 PCR-Programm für eine Kolonie-PCR*

Amplifikationsphase	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	30	
Denaturierung	94	30	
Primerhybridisierung	*	30	30
Elongation	68	**	
Finale Elongation	68	300	

Die Primerhybridisierungstemperatur\* wird immer 5 °C tiefer als die niedrigste Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer gewählt. Die Elongationszeit\*\* richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Genabschnitts. Hier gilt, eine Minute für 1000 Basenpaare.

#### **5.2.1.9. Invitrogen TOPO PCR-Klonierungstechnologie**

Um PCR-Fragmente zuverlässig sequenzieren zu können, können diese einfach und schnell durch die TOPO-TA-Klonierungstechnologie von Invitrogen in ein entsprechendes Plasmid eingefügt werden. Bei dieser Methode wurde wie im Herstellerprotokoll angegeben vorgegangen.

#### **5.2.1.10. Plasmidpräparation**

Die Plasmidpräparationen wurden mit Reaktionskits der Firma QIAGEN durchgeführt. Für Präparationen im kleinen Maßstab wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ und für Präparationen im größeren Maßstab das „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ verwendet. Hierbei wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Minipreps wurden in 25 µL Wasser ausgenommen, Maxipreps wurden mit Wasser auf eine Konzentration von 1 µg/µL eingestellt.

#### **5.2.1.11. Bestimmung von DNA-Konzentrationen**

Die DNA-Konzentration wird mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Hierbei wird Wasser als Nullprobe eingesetzt. Es wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ) detektiert. Außerdem werden, um die

Reinheit der DNA zu bestimmen, die Absorption bei 230 nm und 280 nm bestimmt.

Von den Plasmidpräparationen wird 1 µL mit 99 µL Wasser gemischt und in eine Küvette gegeben. Durch die Verdünnung und den Umrechnungsfaktor für DNA ergibt sich folgende Formel zum Errechnen der DNA-Konzentration.

$$A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Umrechnungsfaktor(dsDNA)} = \text{DNA} - \text{Konz.}$$

$$A_{260} \times 100 \times 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = \text{DNA} - \text{Konz.} \quad (1)$$

### 5.2.1.12. Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden von dem Sequenzierservice des Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig vorgenommen. Hierfür werden lediglich das zu sequenzierende DNA-Molekül und entsprechende Primer an den Service übergeben.

## **5.2.2. Zellkulturtechnische Methoden**

### **5.2.2.1. Revitalisierung kryokonservierter eukaryotischen Zellen**

Für die Revitalisierung von kryokonservierten Suspensionszellen wird ein Kryovial mit eingefrorenen Zellen für 2 Minuten in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut und die Zellen in 30mL vorinkubiertem Zellkulturmedium in einem 125 mL-Schüttelkolben aufgenommen. Adhärenz wachsende Zellkulturen werden in 20mL vorinkubiertem Zellkulturmedium in einer T75-Flasche aufgenommen.

### **5.2.2.2. Kryokonservierung eukaryotischer Zellen**

Für die Kryokonservierung werden ausreichend Zellen ausgesät und am Tag des Einfrierens geerntet. Pro Vial werden  $10^7$  Zellen in einem Milliliter abgelegt. Das Einfriermedium besteht zu 90 % aus Zellkulturmedium und zu 10 % aus DMSO. Die Vials werden in einen „Mr.Frosty“ gestellt, der mit Isopropanol befüllt ist und dann für 24 Stunden bei -70 °C gelagert. Anschließend werden die Zellen in eine -150°C Truhe oder in einen Stickstofftank umgelagert.

### **5.2.2.3. Kultivierung von CHO Suspensionszellen**

Die CHO Suspensionszellen werden standardmäßig in 125 mL-Glasschüttelkolben mit ca. 30mL Zellkulturmedium kultiviert und alle 3-4 Tage (meistens montags und donnerstags) auf  $3 \times 10^5$  Zellen/mL passagiert. Dabei wird zu einem festen vorgelegten Volumen an Zellkulturmedium (30mL) die entsprechende Menge Zellsuspension gegeben, dass sich eine Zellkonzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/mL ergibt.

Wenn sich ein Antibiotikum im Zellkulturmedium befindet, wird die Zellsuspension vor dem Übertragen in einen neuen Glasschüttelkolben zentrifugiert und der Überstand verworfen. So kann gewährleistet werden, dass die Konzentration des Antibiotikums auf einem gleich bleibenden Level bleibt.

### **5.2.2.4. Kultivierung adhärenter HEK293T Zellen**

Die adhärenenten HEK293T Zellen werden standardmäßig in T75 Zellkulturflaschen mit 30 mL Zellkulturmedium kultiviert und alle 3-4 Tage (montags und donnerstags) in einem Verhältnis von 1:10 passagiert. Für



eine Passage wird das Zellkulturmedium aus der Flasche entfernt und die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 3mL TrypLE für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 7 mL frischem Zellkulturmedium wird die Ablösereaktion des TrypLE abgebrochen. Je ein Milliliter der Zellsuspension wird in eine neue T75 Zellkulturflasche überführt, in der bereits 29 mL frisches Zellkulturmedium vorgelegt wurde.

### **5.2.2.5. Zellzahlbestimmung mittels Cedex HiRes**

Für die Zellzahlbestimmung mittels Cedex HiRes werden 300 µL Probe in ein Cedexgefäß gegeben. Das Gerät mischt die Zellen automatisch mit einer Trypanblaulösung, wobei tote Zellen angefärbt werden. Die Zellsuspension wird dann in eine Zählkammer geleitet, wo nach einer Sedimentationszeit, Fotoaufnahmen gemacht werden, die anschließend von der Software ausgewertet werden. Der Messbereich des Gerätes liegt zwischen  $5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^7$  Zellen pro Milliliter. Weist eine Probe eine höhere Zellkonzentration auf, so wird diese entsprechend mit PBS-Puffer verdünnt.

### **5.2.2.6. Elektroporation (Nucleofection)**

Eine sehr effiziente Transfektionsmethode ist die Nucleofection, bei der die DNA durch eine Elektroporation in eukaryotische Zellen eingebracht und durch spezielle Reagenzien direkt in den Zellkern transportiert werden kann. Die Nucleofection ist eine Erfindung und Marke der Lonza Cologne AG. Für die Transfektion der HIT- und HITB7-Zellen wird das AMAXA Kit V der Firma Lonza verwendet. Die Transfektionen werden nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Die zu transfizierenden Zellen werden einen Tag vor der Transfektion in frisches Medium auf eine Zellkonzentration von  $3 \times 10^5$  Z/mL passagiert. Am Tag der Transfektion werden je  $5 \times 10^6$  Zellen in 15mL-Zentrifugenröhrchen für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wird quantitativ abgenommen und die Zellen in 100µL Transfektionslösung, die zuvor aus 82µL „Nucleofector Solution“ und 18µL „Supplement“ hergestellt wird, aufgenommen. Die Zellsuspension wird dann mit 3µg Plasmid DNA versetzt

und in eine spezielle Küvette überführt. Nach der Durchführung des Transfektionsprogramms U-023, das Lonza speziell für CHO Zellen entwickelt hat, werden die Zellen in 5 mL frischem, vorinkubiertem Zellkulturmedium in 50mL Minireaktoren aufgenommen und inkubiert.

### **5.2.2.7. Selektion und Amplifikation**

Nach einer Transfektion von eukaryotischen Zellen mit einem Produktionsplasmid, müssen Zellen selektiert werden, die das Plasmid stabil in ihr Genom integriert haben. Hierzu wird ein Selektionsdruck auf die Zellen ausgeübt, der dafür sorgt, dass nur Zellen überleben, die das Produktionsplasmid in ihr Genom aufgenommen haben.

Bei der Verwendung von Antibiotikumresistenzen, wird dem Zellkulturmedium das entsprechende Antibiotikum beigelegt. Bei der Verwendung des DHFR-Systems wird der Zusatz von Hypoxanthin und Thymidin (HT-Supplement) eingestellt. Zusätzlich kann durch Zugabe des DHFR-Inhibitors Methotrexat (MTX) in unterschiedlichen Konzentrationen eine Amplifikation des Produktionsplasmides im Genom der Zelle bewirkt werden.

### **5.2.2.8. Herstellung von konditioniertem Medium**

Konditioniertes Medium zeichnet sich dadurch aus, dass, über einen Zeitraum von 2-3 Tagen, bereits Zellen in diesem Zellkulturmedium kultiviert wurden. Dabei werden von den Zellen Signalstoffe an das Medium abgegeben. Dieses Medium eignet sich besonders um Einzelzellklone zum Wachstum anzuregen.

Eine Zellkultur, die über 2-3 Tage lief, wird für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert und der Überstand anschließend mit einem 0,22 µm Filter filtriert.

### **5.2.2.9. Einzelzellklonierung**

Die Einzelzellklonierung wird mittels „limiting dilution“ durchgeführt. Hierbei wird eine Zellkultur über mehrere Stufen so weit verdünnt, dass sich in 30 µL theoretisch nur eine Zelle befindet. Anschließend werden je 30 µL der Zellsuspension in je eine Well einer 384 Well Platte pipettiert. Das

Aussaatmedium besteht dabei zu 50 % aus konditioniertem Medium (siehe 5.2.2.8).

Für die Dokumentation der Einzelzellklone kommt das „NyOne“ der Firma Synentec zum Einsatz. Mit diesem Gerät ist es möglich ein Well einer 384 Well Platte auf einem Foto mit einer vierfach Vergrößerung zu dokumentieren. So kann die Klonalität eindeutig dokumentiert werden.

Für die Bestimmung von Einzelzellklonen bestehen folgende Regeln:

1. An Tag 0 darf keine, oder nur eine Zelle zu sehen sein
2. An Tag 1 dürfen nicht mehr als zwei Zellen zu sehen sein
  - diese dürfen keine große räumliche Trennung aufweisen
3. An Tag 7 bzw. 11 ist eine Zusammenhängende Kolonie zu erkennen
  - da die Zellen gelegentlich „wandern“ kann die Kolonie auch an einem anderen Ort liegen

### **5.2.2.10. Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie wird verwendet um die Expression visueller Markergene, wie zum Beispiel grün fluoreszierendes Protein (GFP), nachzuweisen und relativ zu quantifizieren. Dafür wird die Probe der Zellsuspension mit Propidiumiodid behandelt. Dieser Farbstoff kann durch die Membran toter Zellen diffundieren und interkaliert dort in die DNA, wodurch die Zellen in der Durchflusszytometrie durch eine rote Färbung detektiert werden können.

Im ersten Schritt der Analyse werden so lebende von toten Zellen unterschieden, sodass im zweiten Schritt der Durchflusszytometrie, ausgehend von den lebenden Zellen, der Anteil an GFP positiven Zellen und eine relative mittlere Fluoreszenzintensität ermittelt werden kann.

Die Propidiumiodidlösung wird zunächst 1:10 in PBS verdünnt und je 180 µL pro Messung in einem Well einer 96Wellplatte vorgelegt. Zu dem vorgelegten Farbstoff werden dann 20 µL der Zellsuspension gegeben und für ca. 5 Minuten, unter Ausschluss von Licht, inkubiert. Anschließend werden die Proben mit dem Guava Durchflusszytometer und dem Programm GuavaExpress analysiert.

#### 5.2.2.11. Batchkultivierung

Bei einer Batchkultivierung wird ein definiertes Volumen mit einer definierten Zellkonzentration angeimpft und über einen definierten Zeitraum, bzw. bis zu einem definierten Abbruchkriterium, kultiviert.

Die Batch-Versuche wurden in einem 250 mL Schüttelkolben in einem Volumen von 60 mL Zellkulturmedium vorgenommen. Die Startzellkonzentration betrug  $5 \times 10^5$  Z/mL und die Inkubation wurde bei 5 % CO<sub>2</sub>, 125 rpm und 37 °C durchgeführt.

#### 5.2.2.12. Fed-Batchkultivierung

Die Fed-Batchkultivierung unterscheidet sich darin von der Batchkultivierung, dass während des Prozesses an bestimmten Tagen oder basierend auf Messwerten Nährstoffe zu den Ansätzen gegeben werden. Bei den in dieser Promotionsarbeit durchgeführten standardisierten Prozesse im 60 mL-Maßstab wurde eine zu dem Zellkulturmedium (ExCellCHO Advanced) abgestimmte Feedlösung (ExCellCHO Advanced Feed1) an den Tagen 3, 5, 7, 9, 11 und 13 im Verhältnis von 7,5 % zum Startvolumen zu der Kultivierung gegeben. Das Glukosefeeding wurde ab einer Konzentration von 4 g/L auf 4 g/L vorgenommen.

#### 5.2.2.13. Bestimmung der spezifischen Produktivität von Suspensionszellen

Bei Batch und Fed-Batch Kultivierungen wurde die spezifische Produktivität über den gesamten Kulturzeitraum ermittelt. Hierfür wurde das Integral der viablen Zellzahl über die Trapezregel berechnet. Dazu wurde folgende Formel verwendet.

$$IVCN [10^9 \text{ Z} \times \text{t}] = \sum_{i=1}^n \frac{(c_{Xv,i} \times V_i) + (c_{Xv,i-1} \times V_{i-1})}{2} \times (t_i - t_{i-1}) \quad (2)$$

$c_{Xv}$	viable Zellkonzentration, $10^9$ Zellen (z/mL)
$V$	Volumen (mL)
$t$	Zeitpunkt der Probenahme, Tag (t)

Teilt man die Menge des gebildeten Produktes durch das Integral der viablen Zellzahl (IVCN), so erhält man die spezifische Produktivität.

$$q_P [pg \times (Z \times t)^{-1}] = \frac{m_P}{IVCN} \quad (3)$$

$q_P$  spezifische Produktivität, Pikogramm/Zellen×Tag (pg/Z×t)

$m_P$  Masse des Produktes, mg

### **5.2.3. Analytische Methoden**

#### **5.2.3.1. Konzentrationsbestimmung von D-Glukose und L-Laktat**

Die Bestimmung der Glukose- und Laktat-Konzentration wurden mit dem Gerät „YSI Analysator Modell 2700 SELECT“ durchgeführt. Proben, die Zellen enthalten, mussten vor der Messung für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert werden.

Die Proben werden bei der Messung an immobilisierten Glukoseoxidase- bzw. L-Laktatoxidase-Enzymen vorbeigeleitet, wo sie unter Freisetzung von Wasserstoffperoxid oxidiert werden. An einer Platinanode wird das Wasserstoffperoxid oxidiert, wodurch Elektronen freigesetzt werden, die einen Signalstrom an einer Sonde bewirken, der proportional zur Glucose- bzw. Laktatkonzentration ist.

#### **5.2.3.2. Bestimmung von pH, pO<sub>2</sub> und pCO<sub>2</sub>**

Die Bestimmung von pH-, pO<sub>2</sub> und pCO<sub>2</sub>-Werten wurde mit dem Gerät pHOX der Firma Bioprofile durchgeführt. Hier werden die Proben ohne Vorbehandlung gemessen, um die entsprechenden Parameter nicht zu beeinflussen.

#### **5.2.3.3. Bestimmung der Osmolalität**

Die Osmolalität gibt die Anzahl der osmotisch aktiven Teilchen in einer Lösung an. Diese wird durch die Bestimmung des Gefrierpunkts einer Probe mit Hilfe des SEMI-MICRO Osmometer K7400 der Firma Knauer GmbH ermittelt. Als Referenz dienen AP-Wasser und ein Standard mit einer Osmolalität von 300 mOsmol.

#### **5.2.3.4. Gesamtproteinbestimmung mittels Bradford**

Bevor der Gesamtproteingehalt einer Probe bestimmt werden kann, wird ein Schnelltest durchgeführt, durch den abgeschätzt werden kann, ob die Proben verdünnt werden müssen. In einem Well einer 96-Well Platte werden 10 µL der zu messenden Probe vorgelegt und dann 300 µL Comassie Plus Reagenz hinzugegeben. Je nachdem wie ausgeprägt die Blaufärbung ist, wird die Probe verdünnt und erneut ein Schnelltest durchgeführt.

Als Standard wird Bovines Gamma Globulin (BGG) bzw. Bovines Serum Albumin (BSA) eingesetzt und in den Konzentrationen 125 µg/mL,

250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL, 1000 µg/mL in Dreifachbestimmungen auf eine 96-Well Platte aufgetragen. Je 10 µL der verdünnten Proben werden ebenfalls in Dreifachbestimmung auf die gleiche Platte aufgetragen. Die Messung der Absorption bei 595nm wird nach mindestens 20 Minuten Inkubationszeit vorgenommen. Bevor die Messung gestartet wird, muss darauf geachtet werden, dass sich keine Blasen in den Wells befinden. Diese können gegebenenfalls mit einer sauberen Kanüle entfernt werden.

#### 5.2.3.5. SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ist ein Analyseverfahren, bei dem Proteine der Größe nach aufgetrennt und durch Anfärbung sichtbar gemacht werden. Durch den Einsatz von anionischen Tensiden (SDS/LDS) wird das Protein linearisiert und verliert durch Überlagerung die Eigenladung. Durch Zugabe reduzierender Thiole, in diesem Fall Mercaptoethanol, können zusätzlich Disulfidbrücken aufgetrennt werden.

Mit Hilfe der Software Image Lab™ kann dann der prozentuale Anteil einer Proteinbande an einem Proteingemisch bestimmt werden. Bei allen Proteinelektrophoresen wurden die NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tis Protein Gele und das NuPAGE® MOPS SDS Buffer Kit verwendet.

Die Zellkulturüberstände einer Kultivierung werden ausgehend von einer Proteinbestimmung mittels Bradford so mit AP-Wasser verdünnt, dass pro Ansatz 5 µg Protein enthalten sind.

**Tabelle 5-18 Probenvorbereitung für Proteingelelektrophorese**

Reagenz	nicht reduzierende Bedingungen	reduzierende Bedingungen
Probe	x µL	x µL
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	5 µL	5 µL
NuPAGE® Reducing Agent (DTT) (10X)	-	2 µL
ad AP	20 µL	20 µL

Die Proben werden gut durchmischt, kurz zentrifugiert und dann für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Je 20 µL der Proben und 10 µL des Markers werden dann in je eine Tasche eines NuPAGE® Proteingels geladen. Die Elektrophorese wird für 50 Minuten bei konstanten 200 Volt gefahren. Anschließend werden die Gele drei Mal mit AP-Wasser gewaschen und mit Imperial Protein Stain Lösung gefärbt. Für die Entfärbung des Hintergrunds werden die Gele erneut mit AP Wasser gewaschen.

#### 5.2.3.6. Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die SEC ist ein Methode mit der ein Monomer/Dimer Verhältnis von scFv-Fragmenten ermittelt werden kann. Hierzu muss das Produkt zunächst aus dem Zellkulturüberstand isoliert werden.

Der erste Schritt der Aufreinigung von Zellüberstand ist ein Zentrifugationsschritt bei 300 g für 15 Minuten, um die Zellen aus dem Überstand zu entfernen. Anschließend wird der Überstand mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert. Um den Auftrag auf die Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) zu beschleunigen wurde der Überstand um den Faktor 5 konzentriert und in Phosphat-Puffer (KPi) umgepuffert. Die Aufkonzentrierung wurde mit der SartoFlow® Smart der Firma Sartorius und der Membran Sartoclon Slice 200 vorgenommen. Die anschließende *immobilized metal ion affinity chromatography* (IMAC) wurde mit einer Nickel-Säule „IMAC Sepharose 6 Fast Flow“ und der Anlage „ÄKTA pure“ durchgeführt. Die Größenausschlusschromatographie wurde mit der Säule „TSKgel G2000SW<sub>XL</sub>“ und der Anlage „Agilent 1100“ und der in **Tabelle 5-19** beschriebenen Sequenz durchgeführt.

**Tabelle 5-19: Parameter der SEC**

Parameter	Wert
Flussrate	0,5 mL/min
Injektionsvolumen	50 µL
Druck	32 bar
Standard	BioRad SEC Standard
Detektion	280 nM (DAD)



#### 5.2.3.7. Protein A-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bei der HPLC handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem das Produkt mit einer flüssigen, mobilen Phase über eine spezifisch bindende stationäre Phase geleitet wird. Das Produkt bindet an die Bindungsstellen der stationären Phase und kann durch eine pH-Wertänderung (Stoßelution) eluiert werden. Die Proteinkonzentration im Eluat wird mittels UV-Messung bestimmt.

Bei dem Ladepuffer wird ein pH-Wert von 7,2 und bei dem Elutionspuffer pH-Wert von 2,5 eingestellt. Für die Konzentrationsbestimmung von Antikörpern wurde die Säule „POROS™ Prepacked Protein A“ der Firma ThermoFisher Scientific und der HPLC-Anlage Agilent 1100 durchgeführt.

#### 5.2.3.8. Aktivitätstest eines Antikörpers mittels ELISA

Die Bindungsaktivität des produzierten Antikörpers wurde mithilfe eines ELISAs bestimmt. Bei dieser Analysemethode kann lediglich bestimmt werden, ob der Antikörper das Antigen bindet oder nicht. Der Überstand der Produktion wurde dabei auf das spezifische Antigen gegeben und mit einem zweiten Antikörper gebunden, der an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, die ein Substrat, unter Änderung der Farbe, umsetzen kann.

Eine MaxiSorp ELISA-Platte wird über Nacht bei 4 °C mit 100 µL vom Antigen (5 µg/mL) inkubiert, wobei dieses an der Oberfläche des Bodens bindet. Am nächsten Tag wird die Platte drei Mal mit Waschpuffer gespült und dann zwei Stunden mit dem *blocking*-Puffer „Super Block T20“ bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird der Überstand der Produktion aufgetragen und für eine Stunde inkubiert. Als negativkontrolle werden sowohl Überstände eines anderen Produktionsprozessen, als auch Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) aufgetragen. Es folgt ein weiterer Waschschrift und die anschließende Zugabe des *anti-human-IgG-HRP* Antikörpers. Die Inkubation erfolgt auch hier bei Raumtemperatur für eine Stunde. Nach einem weiteren Waschschrift werden 100 µL des Substrats TMB/E zu den Ansätzen gegeben und je nach Färbung nach etwa 5-30 Minuten durch Zugabe von 50 µL Schwefelsäure die Färbereaktion abgestoppt. Die fotometrische Messung wird bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt.

## Literaturverzeichnis

1. Walsh G (2014) Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat Biotechnol* 32(10): 992–1000. doi: 10.1038/nbt.3040
2. Kelley B (2014) Industrialization of mAb production technology: The bioprocessing industry at a crossroads. *MAbs* 1(5): 443–452. doi: 10.4161/mabs.1.5.9448
3. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB et al. (2007) The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 25: 21–50. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702
4. Kim JY, Kim Y-G, Lee GM (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 93(3): 917–930. doi: 10.1007/s00253-011-3758-5
5. Nelson AL, Reichert JM (2009) Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nat Biotechnol* 27(4): 331–337. doi: 10.1038/nbt0409-331
6. Holliger P, Hudson PJ (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23(9): 1126–1136. doi: 10.1038/nbt1142
7. Ecker DM, Jones SD, Levine HL (2015) The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs* 7(1): 9–14. doi: 10.4161/19420862.2015.989042
8. Cotton, R. G. H. & Milstein, C. (1973) Fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells. *Nature*: 42–43
9. Köhler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*(256): 495–497
10. C. Sgro (1995) Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/ orthoclone OKT3 : bibliographic review. *Elsevier*(105): 23–29
11. Hwang WYK, Foote J (2005) Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* 36(1): 3–10. doi: 10.1016/j.ymeth.2005.01.001
12. Daveid M. Kneight, Carrie Wagner et. al. (1995) The immunogenicity of the 7E3 murine Monoclonal FAB antibody fragment variable region is dramatically reduced in humans by substitution of human for murine constant regions. *Elsevier Science Ltd*(32.): 1271–1281
13. Chintalacheruvu Kea (1995) Chimeric Antibodies: Production and Applications. *Methods in Enzymology*(8): 73–82

14. Tsurushita N, Hinton PR, Kumar S (2005) Design of humanized antibodies: From anti-Tac to Zenapax. *Methods* 36(1): 69–83. doi: 10.1016/j.ymeth.2005.01.007
15. George P. Smith (1985) Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science*(228): 1315–1317
16. Breitling F, Dübel S, Seehaus T et al. (1991) A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 104(2): 147–153. doi: 10.1016/0378-1119(91)90244-6
17. John McCafferty, Andrew D. Griffiths, Greg Winter & David J Chiswell (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains(348): 552-554
18. Barbas CF, Kang AS, Lerner RA et al. (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(18): 7978–7982. doi: 10.1073/pnas.88.18.7978
19. Kügler J, Wilke S, Meier D, et al. (2015) Generation and analysis of the improved human HAL9/10 antibody phage display libraries. *BMC Biotechnol.* 15:10. doi:10.1186/s12896-015-0125-0
20. Rajpal A, Beyaz N, Haber L et al. (2005) A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(24): 8466–8471. doi: 10.1073/pnas.0503543102
21. Martineau P (2002) Error-Prone Polymerase Chain Reaction for Modification of scFvs. In: O'Brien PM, Aitken R (eds) *Antibody Phage Display: Methods and Protocols*, vol 178. Humana Press, Totowa, NJ, pp 287–294
22. van de Putte LBA, Atkins C, Malaise M et al. (2004) Efficacy and safety of adalimumab as monotherapy in patients with rheumatoid arthritis for whom previous disease modifying antirheumatic drug treatment has failed. *Ann Rheum Dis* 63(5): 508–516. doi: 10.1136/ard.2003.013052
23. Frenzel A, Kügler J, Helmsing S et al. (2017) Designing Human Antibodies by Phage Display. *Transfus Med Hemother* 44(5): 312–318. doi: 10.1159/000479633
24. Inbar D, Hochman J, Givol D (1972) Localization of Antibody-Combining Sites within the Variable Portions of Heavy and Light Chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69(9): 2659–2662. doi: 10.1073/pnas.69.9.2659
25. Takashi Yokota, Diane E. Milenic, Marc Whitlow, and Jeffrey Schlom (1992) Rapid Tumor Penetration of a Single-Chain Fv and Comparison with Other Immunoglobulin Forms. *Cancer Research*(52): 3402–3408

26. Lauwereys M, Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A et al. (1998) Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J* 17(13): 3512–3520. doi: 10.1093/emboj/17.13.3512
27. Wang W, Wang EQ, Balthasar JP (2008) Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 84(5): 548–558. doi: 10.1038/clpt.2008.170
28. Roopenian DC, Akilesh S (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7(9): 715–725. doi: 10.1038/nri2155
29. Kontermann RE (2011) Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics. *Curr Opin Biotechnol* 22(6): 868–876. doi: 10.1016/j.copbio.2011.06.012
30. Schlapschy M, Binder U, Börger C et al. (2013) PASylation: A biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel* 26(8): 489–501. doi: 10.1093/protein/gzt023
31. Gobalakrishnan Sundaresan, PhD, Paul J. Yazaki, PhD, John E. Shively, PhD, Ronald D. Finn, PhD<sup>4</sup>, Steven M. Larson, MD<sup>4</sup>, Andrew A. Raubitschek, MD<sup>2,3</sup>, Lawrence E. Williams, PhD<sup>2</sup>, Arion F. Chatziioannou, PhD<sup>1</sup>, Sanjiv S. Gambhir, MD, PhD, and Anna M. Wu, PhD 124I-Labeled Engineered Anti-CEA Minibodies and Diabodies Allow High-Contrast, Antigen-Specific Small-Animal PET Imaging of Xenografts in Athymic Mice
32. Oh P, Li Y, Yu J et al. (2004) Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature* 429(6992): 629–635. doi: 10.1038/nature02580
33. Berting A, Farcet MR, Kreil TR (2010) Virus susceptibility of Chinese hamster ovary (CHO) cells and detection of viral contaminations by adventitious agent testing. *Biotechnol Bioeng* 106(4): 598–607. doi: 10.1002/bit.22723
34. Ghaderi D, Zhang M, Hurtado-Ziola N et al. (2012) Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnol Genet Eng Rev* 28: 147–175
35. Gruh I, Wunderlich S, Winkler M et al. (2008) Human CMV immediate-early enhancer: a useful tool to enhance cell-type-specific expression from lentiviral vectors. *J Gene Med* 10(1): 21–32. doi: 10.1002/jgm.1122

36. Brinster RL, Allen JM, Behringer RR et al. (1988) Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85(3): 836–840. doi: 10.1073/pnas.85.3.836
37. Choi T, Huang M, Gorman C et al. (1991) A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 11(6): 3070–3074. doi: 10.1128/MCB.11.6.3070
38. Palmiter RD, Sandgren EP, Avarbock MR et al. (1991) Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(2): 478–482. doi: 10.1073/pnas.88.2.478
39. Hagner N, Joerger M (2010) Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis. *Cancer Manag Res* 2: 293–301. doi: 10.2147/CMR.S10043
40. Rajagopalan PTR, Zhang Z, McCourt L et al. (2002) Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21): 13481–13486. doi: 10.1073/pnas.172501499
41. Carman MD, Schornagel JH, Rivest RS et al. (1984) Resistance to methotrexate due to gene amplification in a patient with acute leukemia. *J Clin Oncol* 2(1): 16–20. doi: 10.1200/JCO.1984.2.1.16
42. Curt GA, Carney DN, Cowan KH et al. (1983) Unstable methotrexate resistance in human small-cell carcinoma associated with double minute chromosomes. *N Engl J Med* 308(4): 199–202. doi: 10.1056/NEJM198301273080406
43. Horns RC, Dower WJ, Schimke RT (1984) Gene amplification in a leukemic patient treated with methotrexate. *J Clin Oncol* 2(1): 2–7. doi: 10.1200/JCO.1984.2.1.2
44. Stark GR, Debatisse M, Giulotto E et al. (1989) Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell* 57(6): 901–908. doi: 10.1016/0092-8674(89)90328-0
45. Coquelle A, Pipiras E, Toledo F et al. (1997) Expression of Fragile Sites Triggers Intrachromosomal Mammalian Gene Amplification and Sets Boundaries to Early Amplicons. *Cell* 89(2): 215–225. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80201-9
46. Singer MJ, Mesner LD, Friedman CL et al. (2000) Amplification of the human dihydrofolate reductase gene via double minutes is initiated by chromosome breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 7921–7926. doi: 10.1073/pnas.130194897
47. Robert T. Schimke Gene Amplification in Cultured Cells. *The journal of biological Chemistry* 1988(263-13): 5989–5992

48. Oberbek A, Matasci M, Hacker DL et al. (2011) Generation of stable, high-producing CHO cell lines by lentiviral vector-mediated gene transfer in serum-free suspension culture. *Biotechnol Bioeng* 108(3): 600–610. doi: 10.1002/bit.22968
49. Gorman C, Bullock C (2000) Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. *Curr Opin Biotechnol* 11(5): 455–460. doi: 10.1016/S0958-1669(00)00127-0
50. Plewa C (2010) Application of lentiviral vectors for development of production cell lines and safety testing of lentiviral-derived cells or products. *PDA J Pharm Sci Technol* 64(5): 386–391
51. Bushman F, Lewinski M, Ciuffi A et al. (2005) Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat Rev Microbiol* 3(11): 848–858. doi: 10.1038/nrmicro1263
52. Joung JK, Sander JD (2013) TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(1): 49–55. doi: 10.1038/nrm3486
53. Carlson DF, Tan W, Lillico SG et al. (2012) Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(43): 17382–17387. doi: 10.1073/pnas.1211446109
54. Carroll D (2011) Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* 188(4): 773–782. doi: 10.1534/genetics.111.131433
55. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 31(7): 397–405. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004
56. Lee JS, Kallehauge TB, Pedersen LE et al. (2015) Site-specific integration in CHO cells mediated by CRISPR/Cas9 and homology-directed DNA repair pathway. *Sci Rep* 5: 8572. doi: 10.1038/srep08572
57. He X, Tan C, Wang F et al. (2016) Knock-in of large reporter genes in human cells via CRISPR/Cas9-induced homology-dependent and independent DNA repair. *Nucleic Acids Res* 44(9): e85. doi: 10.1093/nar/gkw064
58. Bludau E Untersuchungen zur Leistungsfähigkeit von Zelllinien mit Kassettenaustauschsystem. @Braunschweig, Techn. Univ., Diss., 2015. <http://www.digibib.tu-bs.de/?docid=00059727>
59. Zhang L, Inniss MC, Han S et al. (2015) Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) for monoclonal antibody expression in the commercially relevant CHOK1SV cell line. *Biotechnol Prog* 31(6): 1645–1656. doi: 10.1002/btpr.2175

60. Turan S, Zehe C, Kuehle J et al. (2013) Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) - a rapidly-expanding toolbox for targeted genomic modifications. *Gene* 515(1): 1–27. doi: 10.1016/j.gene.2012.11.016
61. Rose T, Knabe A, Berthold R et al. (2013) A robust RMCE system based on a CHO-DG44 platform enables efficient evaluation of complex biological drug candidates. *BMC Proc* 7(Suppl 6): P66. doi: 10.1186/1753-6561-7-S6-P66
62. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol* 8(5): 317–327. doi: 10.1038/nrmicro2315
63. Karvelis T, Gasiunas G, Siksnys V (2017) Methods for decoding Cas9 protospacer adjacent motif (PAM) sequences: A brief overview. *Methods* 121-122: 3–8. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.03.006
64. Hsu PD, Lander ES, Zhang F (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157(6): 1262–1278. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010
65. Barrangou R, Marraffini LA (2014) CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell* 54(2): 234–244. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.011
66. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K et al. (1987) Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169(12): 5429–5433. doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
67. Jansen R, van Embden JDA, Gastra W et al. (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 43(6): 1565–1575. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x
68. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J et al. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 60(2): 174–182. doi: 10.1007/s00239-004-0046-3
69. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H et al. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315(5819): 1709–1712. doi: 10.1126/science.1138140
70. Dang Y, Jia G, Choi J et al. (2015) Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. *Genome Biol* 16: 280. doi: 10.1186/s13059-015-0846-3
71. Saleh-Gohari N, Helleday T (2004) Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res* 32(12): 3683–3688. doi: 10.1093/nar/gkh703

72. Pardo B, Gómez-González B, Aguilera A (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* 66(6): 1039–1056. doi: 10.1007/s00018-009-8740-3
73. Weterings E, van Gent DC (2004) The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair (Amst )* 3(11): 1425–1435. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.06.003
74. Mali P, Yang L, Esvelt KM et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339(6121): 823–826. doi: 10.1126/science.1232033
75. Kito M, Itami S, Fukano Y et al. (2002) Construction of engineered CHO strains for high-level production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 60(4): 442–448. doi: 10.1007/s00253-002-1134-1
76. Huang Y, Li Y, Wang YG et al. (2007) An efficient and targeted gene integration system for high-level antibody expression. *Journal of Immunological Methods* 322(1-2): 28–39. doi: 10.1016/j.jim.2007.01.022
77. Larson MH, Gilbert LA, Wang X et al. (2013) CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat Protoc* 8(11): 2180–2196. doi: 10.1038/nprot.2013.132
78. Kim D, Rossi J (2008) RNAi mechanisms and applications. *BioTechniques* 44(5): 613–616. doi: 10.2144/000112792
79. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA et al. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152(5): 1173–1183. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022
80. Simon Schröder (2015) Generierung einer Produktionsplattform zur Herstellung von APIs. Masterarbeit, TU Braunschweig
81. Birch JR, Racher AJ (2006) Antibody production. *Adv Drug Deliv Rev* 58(5-6): 671–685. doi: 10.1016/j.addr.2005.12.006
82. Kober L, Zehe C, Bode J (2013) Optimized signal peptides for the development of high expressing CHO cell lines. *Biotechnol Bioeng* 110(4): 1164–1173. doi: 10.1002/bit.24776
83. Wurm FM (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22(11): 1393–1398. doi: 10.1038/nbt1026
84. Assaraf YG, Schimke RT (1987) Identification of methotrexate transport deficiency in mammalian cells using fluoresceinated methotrexate and flow cytometry.



- Proceedings of the National Academy of Sciences 84(20): 7154–7158. doi: 10.1073/pnas.84.20.7154
85. Daniel A. Haber, Stephen M. Beverley, Mary L. Kielyn, and Robert T. Schimke (1981) Properties of an Altered Dihydrofolate Reductase Encoded by Amplified Genes in Cultured Mouse Fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* (256): 9501–9510
86. Le Cong, Zhang F (2015) Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Methods Mol Biol* 1239: 197–217. doi: 10.1007/978-1-4939-1862-1\_10
87. Xu X, Nagarajan H, Lewis NE et al. (2011) The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat Biotechnol* 29(8): 735–741. doi: 10.1038/nbt.1932
88. Sigrist CJA (2002) PROSITE: A documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Briefings in Bioinformatics* 3(3): 265–274. doi: 10.1093/bib/3.3.265
89. Ronda C, Pedersen LE, Hansen HG et al. (2014) Accelerating genome editing in CHO cells using CRISPR Cas9 and CRISPy, a web-based target finding tool. *Biotechnol Bioeng* 111(8): 1604–1616. doi: 10.1002/bit.25233
90. Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A et al. (2013) Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development* 140(24): 4982–4987. doi: 10.1242/dev.099085
91. Zhang X-H, Tee LY, Wang X-G et al. (2015) Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol Ther Nucleic Acids* 4: e264. doi: 10.1038/mtna.2015.37
92. Urlaub G, Chasin LA (1980) Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(7): 4216–4220
93. Florin L, Lipske C, Becker E et al. (2011) Supplementation of serum free media with HT is not sufficient to restore growth properties of DHFR<sup>-/-</sup> cells in fed-batch processes - Implications for designing novel CHO-based expression platforms. *J Biotechnol* 152(4): 189–193. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.02.002
94. Recillas-Targa F (2006) Multiple Strategies for Gene Transfer, Expression, Knockdown, and Chromatin Influence in Mammalian Cell Lines and Transgenic Animals. *MB* 34(3): 337–354. doi: 10.1385/MB:34:3:337
95. Patel AA, Steitz JA (2003) Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(12): 960–970. doi: 10.1038/nrm1259

96. Yoshikawa, T., Nakanishi, F., Itami, S. et al. (2000) Evaluation of stable and highly productive gene amplified CHO cell line based on the location of amplified genes. *Cytotechnology*(33): 37–46
97. Heidi Rath, Thea Tlsty, and Robert T. Schimke (1984) Rapid Emergence of Methotrexate Resistance in Cultured Mouse Cells. *Cancer Research*(44): 3303–3306
98. Martínez VS, Buchsteiner M, Gray P et al. (2015) Dynamic metabolic flux analysis using B-splines to study the effects of temperature shift on CHO cell metabolism. *Metabolic Engineering Communications* 2: 46–57. doi: 10.1016/j.meteno.2015.06.001
99. Barbara J. Trask and Joyce L. Hamlin (1989) Early dihydrofolate reductase gene amplification events in CHO cells usually occur on the same chromosome arm as the original locus. *GENES & DEVELOPMENT*: 1913–1925
100. Zagari F, Jordan M, Stettler M et al. (2013) Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *N Biotechnol* 30(2): 238–245. doi: 10.1016/j.nbt.2012.05.021
101. Sletta H, Nedal A, Aune TEV et al. (2004) Broad-host-range plasmid pJB658 can be used for industrial-level production of a secreted host-toxic single-chain antibody fragment in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 70(12): 7033–7039. doi: 10.1128/AEM.70.12.7033-7039.2004
102. Kipriyanov SM, Moldenhauer G, Little M (1997) High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures. *Journal of Immunological Methods* 200(1-2): 69–77. doi: 10.1016/S0022-1759(96)00188-3
103. Alexander A. KORTT, Robyn L. MALBY, J. Bruce CALDWELL, L. Clem GRUEN, Neva IVANCIC, Michael C. LAWRENCE, Geoffrey J. HOWLETT, Robert G. WEBSTER, Peter J. HUDSON and Peter M. COLMAN (1994) Recombinant anti-sialidase single-chain variable fragment antibody. *Eur. J. Biochem.*(221): 151–157
104. Lee YC, Boehm MK, Chester KA et al. (2002) Reversible Dimer Formation and Stability of the Anti-tumour Single-chain Fv Antibody MFE-23 by Neutron Scattering, Analytical Ultracentrifugation, and NMR and FT-IR Spectroscopy. *Journal of Molecular Biology* 320(1): 107–127. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00403-5
105. Fallecker C, Tarbouriech N, Habib M et al. (2013) Structural and functional characterization of the single-chain Fv fragment from a unique HCV E1E2-specific

- monoclonal antibody. FEBS Lett 587(20): 3335–3340. doi: 10.1016/j.febslet.2013.07.057
- 106.Arndt KM, Müller KM, Plückthun A (1998) Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. Biochemistry 37(37): 12918–12926. doi: 10.1021/bi9810407
- 107.Lee Y-K, Brewer JW, Hellman R et al. (1999) BiP and Immunoglobulin Light Chain Cooperate to Control the Folding of Heavy Chain and Ensure the Fidelity of Immunoglobulin Assembly. Molecular Biology of the Cell 10(7): 2209–2219. doi: 10.1091/mbc.10.7.2209
- 108.Feige MJ, Groscurth S, Marcinowski M et al. (2009) An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. Mol Cell 34(5): 569–579. doi: 10.1016/j.molcel.2009.04.028
- 109.Schlatter S, Stansfield SH, Dinnis DM et al. (2005) On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells. Biotechnol Prog 21(1): 122–133. doi: 10.1021/bp049780w
- 110.Chen C, Chasin LA (1998) Cointegration of DNA Molecules Introduced into Mammalian Cells by Electroporation. Somat Cell Mol Genet 24(4): 249–256. doi: 10.1023/B:SCAM.0000007127.80657.10
- 111.Li J, Zhang C, Jostock T et al. (2007) Analysis of IgG heavy chain to light chain ratio with mutant Encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site. Protein Eng Des Sel 20(10): 491–496. doi: 10.1093/protein/gzm038
- 112.Dul JL, Aviel S, Melnick J et al. (1996) Ig light chains are secreted predominantly as monomers. J Immunol 157(7): 2969–2975
- 113.Mueller PR, Wold B, Garrity PA (2001) Ligation-mediated PCR for genomic sequencing and footprinting. Curr Protoc Mol Biol Chapter 15: Unit 15.3. doi: 10.1002/0471142727.mb1503s56
- 114.Ho SCL, Bardor M, Feng H et al. (2012) IRES-mediated Tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines. J Biotechnol 157(1): 130–139. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.09.023
- 115.Jostock T, Dragic Z, Fang J et al. (2010) Combination of the 2A/furin technology with an animal component free cell line development platform process. Appl Microbiol Biotechnol 87(4): 1517–1524. doi: 10.1007/s00253-010-2625-0

116. Mesner LD, Hamlin JL, Dijkwel PA (2003) The matrix attachment region in the Chinese hamster dihydrofolate reductase origin of replication may be required for local chromatid separation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6): 3281–3286. doi: 10.1073/pnas.0437791100
117. Liebich I (2002) S/MARt DB: a database on scaffold/matrix attached regions. *Nucleic Acids Res* 30(1): 372–374. doi: 10.1093/nar/30.1.372
118. Zhao C-P, Guo X, Chen S-J et al. (2017) Matrix attachment region combinations increase transgene expression in transfected Chinese hamster ovary cells. *Sci Rep* 7: 42805. doi: 10.1038/srep42805
119. Kim J-M, Kim J-S, Park D-H et al. (2004) Improved recombinant gene expression in CHO cells using matrix attachment regions. *J Biotechnol* 107(2): 95–105
120. Brezinsky SCG, Chiang GG, Szilvasi A et al. (2003) A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. *Journal of Immunological Methods* 277(1-2): 141–155. doi: 10.1016/S0022-1759(03)00108-X
121. Zuberbühler K, Palumbo A, Bacci C et al. (2009) A general method for the selection of high-level scFv and IgG antibody expression by stably transfected mammalian cells. *Protein Eng Des Sel* 22(3): 169–174. doi: 10.1093/protein/gzn068
122. Cassan M, Rousset J-P (2001) UAG readthrough in mammalian cells: Effect of upstream and downstream stop codon contexts reveal different signals. *BMC Mol Biol* 2(1): 3. doi: 10.1186/1471-2199-2-3
123. Lang S, Drewello D, Wichter J et al. (2016) Surface display vectors for selective detection and isolation of high level antibody producing cells. *Biotechnol Bioeng* 113(11): 2386–2393. doi: 10.1002/bit.26000

## Abkürzungsverzeichnis

6xHis	His-Tag
ampR	Ampicillin-Resistenz-Gen
AK	Antikörper
AP	Aqua purificata
API	active pharmaceutical ingredient / Aktive Pharmazeutische Substanz
BGG	Bovines Gamma Globulin
bp	Basenpaare / <i>base pairs</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
c	Zellen / <i>cells</i>
Cas9	CRISPR-associated
CH	konstante schwere Kette / <i>constant heavy chain</i>
CHO	Chinese Hamster Ovary
CL	konstante leichte Kette / <i>constant light chain</i>
CMV	Cytomegalovirus
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
d	days
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure / <i>deoxyribonucleic acid</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
E.coli	Escherichia coli
EF1 $\alpha$	Elongationsfaktor 1 $\alpha$ / elongation factor 1 $\alpha$
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	Durchflusszytometrie / <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
Flp	Flippase
FRT	Flp Erkennungssequenz / <i>Flp recognition target</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht / <i>Forward scatter</i>
g	Gramm
G418	Geneticin

GFP	grün fluoreszierendes Protein
GOD	Glukoseoxidase
GOI	gene of interest / betreffendes Gen
h	Stunde / <i>hour</i>
HC	schwere Kette / <i>heavy chain</i>
HCP	Protein der Wirtszelle / <i>host cell protein</i>
HDR	Homologiegeleitete Reparatur / <i>homology directed repair</i>
HRP	Meerrettichperoxidase / <i>horseradish peroxidase</i>
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle / <i>internal ribosomal entry site</i>
IVCN	Integral der viablen Zellzahl
L	Liter
LC	leichte Kette / <i>light chain</i>
LOD	Latoseoxidase
LSC	leaky stop codon
M	molar
mAK	monoklonaler Antikörper
MCS	Multiklonierungsstelle / <i>multiple cloning side</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität / <i>mean fluorescence intensity</i>
mg	Milligramm
mL	Milliliter
MTX	Methotrexat
ng	Nanogramm
NHEJ	Non-homologous end-joining / Nicht-Homologes Verbinden
nL	Nanoliter
ori	Replikationsursprung / <i>origin of replication</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese / <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung / <i>phosphate buffered saline</i>
pcd	Spezifische Produktivität / <i>picogram per cell per day</i>
PCR	polymerase chain reaction/ Polymerase-Kettenreaktion
rE	relative Einheit

RMCE	rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch / <i>recombinase-mediated cassette exchange</i>
RNA	Ribonukleinsäure / <i>ribonucleid acid</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute / <i>rounds per minute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat / <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	Größenausschlusschromatographie / <i>Size-exclusion chromatography</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht / <i>sideward scatter</i>
t	Tage
TF	Transfektion
u.a.	unter anderem
VH	varibale Domäne der schweren Kette / <i>varibale domain heavy chain</i>
VL	Varibale Domäne der leichten Kette / <i>varibale domain light chain</i>
w/	with / mit
w/o	without / ohne
WFI	<i>water for injection</i> / Wasser für Injektionszwecke
Wt	Wildtyp / <i>wild type</i>
Z	Zellen
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau eines Antikörpers (Immunglobulin G).....	10
Abbildung 1-2: Arten von Antikörpern.....	11
Abbildung 1-3: Gängige Antikörperfragmente.....	12
Abbildung 1-4 Aufbau eines Expressionsplasmids.....	15
Abbildung 1-5 Aufbau eines Expressionsplasmids mit DHFR als Selektionsgen.....	17
Abbildung 1-6: Schematische Darstellung des Kassettenaustausches.....	18
Abbildung 1-7: Ablauf der Abwehrreaktion eines Bakteriums .....	19
Abbildung 1-8: Ortsspezifische Integration einer Expressionskassette .....	21
Abbildung 3-1: Kill curve der HIT-CHO-Zelllinie mit MTX.....	25
Abbildung 3-2: Lage der generierten gRNA auf dem DHFR Gen in der Region des Exon1.....	26
Abbildung 3-3: CRISPR/Cas9-Plasmid;.....	27
Abbildung 3-4: Auswahl der gDNA Sequenzen,.....	28
Abbildung 3-5: Aufnahmen des Wells B7.....	29
Abbildung 3-6: Verlauf der Viabilität der Klone B7 und J17 .....	30
Abbildung 3-7: Aufnahmen des Wells B7 zehn Tage nach der Transfektion.....	31
Abbildung 3-8: Ergebnisse der Sequenzierung.....	32
Abbildung 3-9: Karte des GFP exprimierenden Plasmids.....	33
Abbildung 3-10: Verlauf der Viabilität bei der Selektion ohne HT. ....	34
Abbildung 3-11: Prozentualer Anteil an GFP positiven Zellen.....	35
Abbildung 3-12: Mittlere Fluoreszenzintensität der GFP exprimierenden HITB7 Zellen.....	36
Abbildung 3-13: Verlauf der Viabilität bei Amplifikation.....	37
Abbildung 3-14: Amplifikation des GFP-Gens durch MTX Zugabe. ....	38
Abbildung 3-15: Verlauf der Viabilität während der Selektion. ....	40
Abbildung 3-16: Verlauf der Viabilität während der Amplifikation.....	41
Abbildung 3-17: Steigerung der Produktivität durch MTX Zugabe. ....	42
Abbildung 3-18 Produktkonzentration und mitl. zellspez. Produktivität.....	43
Abbildung 3-19: Verlauf der viablen Gesamtzellzahl und der Viabilität der zwei betrachteten Klone. ....	44
Abbildung 3-20: Verlauf der viablen Gesamtzellzahl und der Viabilität der adaptierten Zellen.....	45



<b>Abbildung 3-21: Produktivität des adaptierten Klons P3F10.</b>	46
<b>Abbildung 3-22: Verlauf der Laktatkonzentration des Klons P3F10.</b>	47
<b>Abbildung 3-23: Verlauf der Affinitätsbestimmung des Klons P3L8.</b>	48
<b>Abbildung 3-24: SDS-Gel der Aufarbeitung des scFv-Fragments.</b>	49
<b>Abbildung 3-25: Ergebnis der SEC</b>	50
<b>Abbildung 3-26: Plasmide der Antikörperexpression.</b>	51
<b>Abbildung 3-27: Verlauf der Viabilität der ersten Selektion.</b>	52
<b>Abbildung 3-28: Verlauf der Viabilität der zweiten Selektion.</b>	52
<b>Abbildung 3-29: Mittlere zellspezifische Produktivität der Antikörper (Ak) exprimierenden Zellen.</b>	53
<b>Abbildung 3-30: Verlauf der capture ELISA-Ergebnisse.</b>	54
<b>Abbildung 3-31: Aufbau des all-in-one-Plasmids.</b>	55
<b>Abbildung 3-32: Verlauf der Viabilität bei der Selektion der all-in-one ZLE.</b>	56
<b>Abbildung 3-33: SDS-Gele von Zellüberständen einer Antikörper Produktion.</b>	57
<b>Abbildung 4-1: Fluoreszenzsignal von produzierenden Zellen</b>	62
<b>Abbildung 4-2: Aufbau der Expressionskassette mit leaky stop codon</b>	62
<b>Abbildung 4-3: Expressionskassette der schweren Kette mit einem GFP.</b>	63
<b>Abbildung 5-1 Prinzip der Kolonie-PCR</b>	77
<b>Abbildung 5-2 Prinzip der Kolonie-PCR mit Orientierungsbestimmung</b>	77

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 3-1 Erreichte Produktkonzentrationen mit den entwickelten HIT-Zelllinien.</b>	23
<b>Tabelle 3-2: Produktivitäten der Plattformen-Zelllinien im Poolstadium und als Klon.</b>	59
<b>Tabelle 5-1 Chemikalien und Pufferlösungen</b>	64
<b>Tabelle 5-2 Enzyme und Reaktionspuffer</b>	65
<b>Tabelle 5-3 Geräteliste</b>	66
<b>Tabelle 5-4 Medien und Zusätze</b>	67
<b>Tabelle 5-5 Oligonukleotide</b>	67
<b>Tabelle 5-6 Plasmide/Vektoren</b>	69
<b>Tabelle 5-7 Reaktionskits</b>	70
<b>Tabelle 5-8 Verbrauchsmaterialien</b>	70
<b>Tabelle 5-9 Zelllinien</b>	71
<b>Tabelle 5-10 Software</b>	71
<b>Tabelle 5-11 PCR-Ansatz</b>	72
<b>Tabelle 5-12 PCR-Programm</b>	73
<b>Tabelle 5-13 DNA-Verdau mittels Restriktionsenzym</b>	74
<b>Tabelle 5-14 Ligationsansatz</b>	76
<b>Tabelle 5-15 Religationsansatz</b>	76
<b>Tabelle 5-16 Ansatz einer Kolonie PCR</b>	77
<b>Tabelle 5-17 PCR-Programm für eine Kolonie-PCR</b>	78
<b>Tabelle 5-18 Probenvorbereitung für Proteingelelektrophorese</b>	87
<b>Tabelle 5-19: Parameter der SEC</b>	88

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, um all denjenigen zu danken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Allen voran möchte ich Dr. Markus Heine für die Schaffung der Promotionsstelle am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin und somit für die Ermöglichung dieser Dissertation und für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit danken.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Michael Hust, der die Betreuung dieser Dissertation von Seiten der Technischen Universität Braunschweig übernommen hat. In diesem Zuge danke ich auch Prof. Dr. Stefan Dübel und Prof. Dr. Udo Rau für die Übernahme des Zweitprüfersitzes bzw. des Prüfungsvorsitzes der Disputation.

Des Weiteren möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik/Zelllinienentwicklung für die gute Unterstützung und Zusammenarbeit danken. Der Arbeitsgruppe Aufarbeitungstechnik möchte ich für die Unterstützung bei der Aufreinigung und Chromatographie der von mir produzierten Moleküle danken. Besonders hervorheben möchte ich Nadine Ly und Svenja Steinke-Völzmann, die mich in die Methoden der Aufarbeitung eingeführt bzw. bei der Umsetzung dieser unterstützt haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir das vorangegangene Studium überhaupt erst ermöglicht und mich die gesamte Zeit moralisch unterstützt hat.

Danke!